

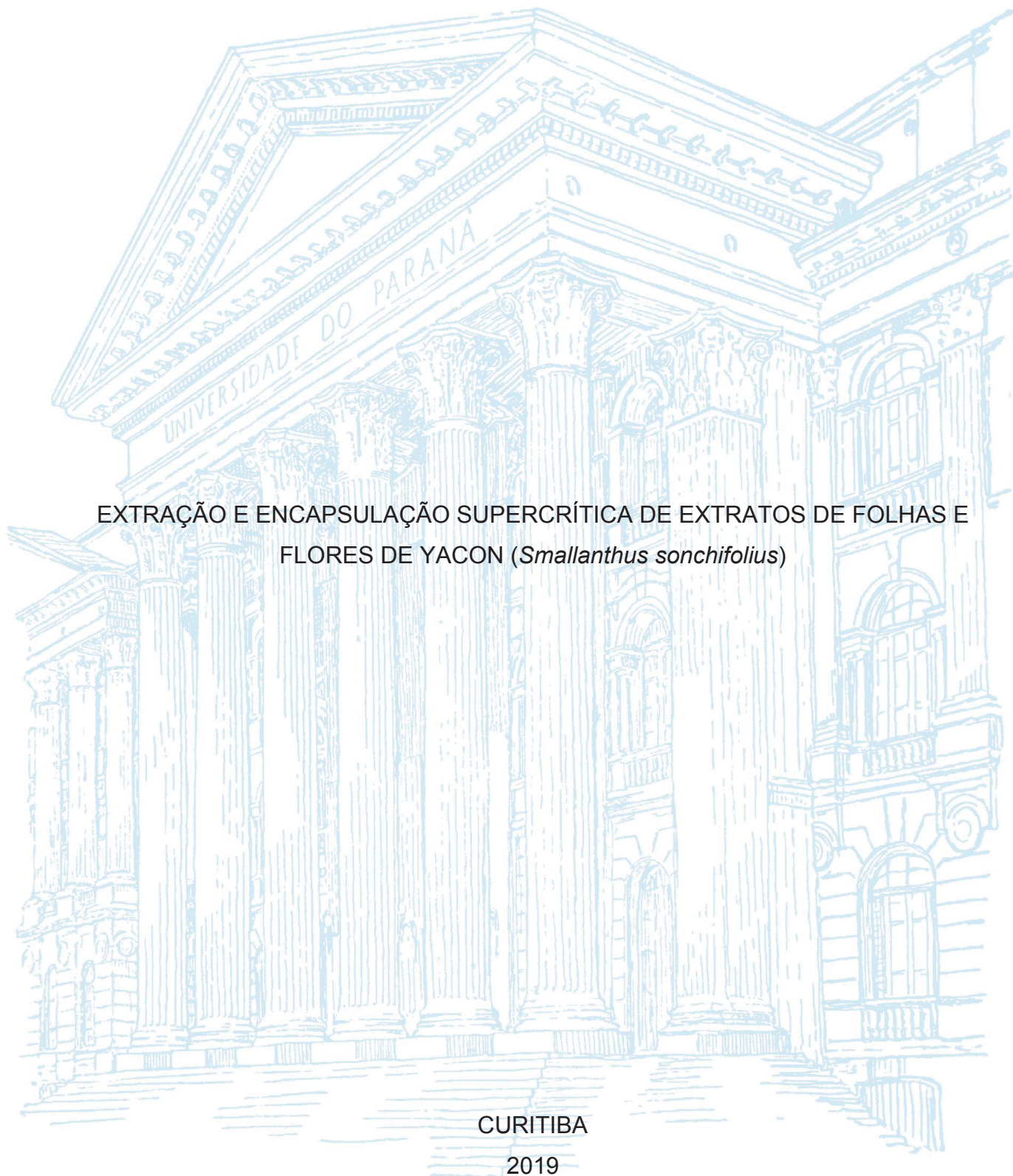
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

POLLYANNA NOGUEIRA DA CRUZ

EXTRAÇÃO E ENCAPSULAÇÃO SUPERCRÍTICA DE EXTRATOS DE FOLHAS E
FLORES DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*)

CURITIBA

2019



POLLYANNA NOGUEIRA DA CRUZ

EXTRAÇÃO E ENCAPSULAÇÃO SUPERCRÍTICA DE EXTRATOS DE FOLHAS E
FLORES DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*)

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Alimentos, no curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Masson

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

C957e

Cruz, Pollyanna Nogueira da

Extração e encapsulação supercrítica de extratos de folhas e flores de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) [recurso eletrônico] / Pollyanna Nogueira da Cruz. – Curitiba, 2019.

Tese – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2019.

Orientadora: Maria Lucia Masson. Coorientador: Marcos Lúcio Corazza.

1. Extração com fluido supercrítico. 2. Antioxidantes. 3. Cromatografia a gás. 4. Cromatografia a líquido. 5. Emulsões. 6. Extração (Química). I. Universidade Federal do Paraná. II. Masson, Maria Lucia. III. Corazza, Marcos Lúcio. IV. Título.

CDD: 615. 321

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de POLLYANNA NOGUEIRA DA CRUZ intitulada: *Extração e encapsulação supercrítica de extratos de folhas e flores de Yacon (Smallanthus sonchifolius)*, sob orientação da Profa. Dra. MARIA LUCIA MASSON, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 18 de Dezembro de 2019.


MARIA LUCIA MASSON
Presidente da Banca Examinadora


ARIADNE REDER CUSTODIO DE SOUZA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE)


FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


AGNES DE PAULA SCHEER
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


SANDRA REGINA SALVADOR FERREIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

*Aos meus pais, por todo amor,
dedicação e incentivo...*

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar meus passos e me dar forças ao longo desta jornada de doutoramento.

Aos meus orientadores, Maria Lúcia Masson e Marcos Lúcio Corazza pela orientação, dedicação e pelos incontáveis ensinamentos que contribuíram para minha formação e para a execução desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela oportunidade de cursar o doutorado, e aos professores do PPGEAL pelos importantes ensinamentos acadêmicos.

À professora Sandra Regina Salvador Ferreira, pela oportunidade de voltar e realizar parte dos experimentos dessa tese no Laboratório de Tecnologia Supercrítica e Termodinâmica (LATESC/UFSC), que é formado por uma equipe maravilhosa de trabalho e acolhimento caloroso. Dessa equipe agradeço em especial à minha amiga Páulia Maria Cardoso Lima Reis pela ajuda essencial no desenvolvimento de uma parte experimental dessa tese.

Ao produtor de yacon Nelson que gentilmente forneceu as matérias-primas e ao técnico Wanderlei do Amaral que ajudou nas coletas e transporte das mesmas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora, pelas contribuições, sugestões e atenção dedicadas ao aperfeiçoamento deste estudo.

Aos colegas do meu laboratório, do LATOS e LACTA pelos momentos de descontração e amizade, em especial o Damian, Carol e Carlos, pelas risadas, desabafos e ajuda.

Aos Meus pais, Lília e Fernando, por minha educação, pelo amor incondicional, incentivo e por estarem sempre presente em minha vida. Amo vocês!

Ao meu companheiro, Otto Júlio, pela ajuda na arrumação das figuras, pela parceria na vida, pelo amor e por não deixar que a distância nos afastasse. Te amo!

Às minhas queridas amigas, Lorena, Ingrid e Rafaela pelo carinho, por apoiar e por tornar os dias tristes e frios em Curitiba em dias alegres!

À todos que de certa forma contribuíram e torceram para o sucesso desse trabalho.

As recompensas são proporcionais aos seus sacrifícios e ao seu empenho.

O caminho mais fácil nem sempre é o mais gratificante.

Ana Carolina

RESUMO

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) pertence à família *Asteraceae* e seu cultivo foi introduzido no Brasil em 1980. As folhas são utilizadas principalmente para a produção de chás, devido às suas propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante. Já suas flores e caules são usualmente descartados, necessitando de estudos que demonstrem seus potenciais para indústrias alimentícias e farmacêuticas. Assim, o objetivo desse trabalho foi a obtenção de extratos das folhas e flores de yacon pelos processos de extração supercrítica (ESC) e Soxhlet e, além disso, a encapsulação de um extrato pelo processo de Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE). Para isso, este estudo foi dividido em duas partes principais. Na primeira, os métodos de extração foram aplicados às matrizes avaliando seu desempenho em termos de rendimento, teor de fenólicos totais, atividade antioxidante (AA), potencial antimicrobiano e cromatografia gasosa. Os métodos de extração utilizados foram: ESC com scCO₂ puro a 50 °C e pressão 20 MPa; ESC com scCO₂ + etanol a 30 - 70 °C, pressões 15 - 25 MPa e razão mássica (RM) 1:1 - 3:1, ESC com scCO₂ + etanol-água a 30 e 70 °C, pressão de 25 MPa com RM 3:1 e Soxhlet com diferentes solventes. Com base nos rendimentos e atividades biológicas um extrato foi selecionado para a continuidade do trabalho. Com o intuito de proteger o extrato e preservar sua bioatividade, a segunda etapa visou a síntese de partículas pela técnica SFEE. Foi avaliada a influência da pressão (9 - 13 MPa) e vazão de emulsão (0,5 - 1,5 mL/min) do SFEE na eficiência de encapsulação e no teor residual de acetato de etila durante a formação de partículas do extrato encapsulado em amido de milho modificado. A estabilidade das suspensões, as características morfológicas e térmicas e a AA das partículas também foram avaliadas. Os resultados demonstraram bom desempenho da ESC na recuperação dos extratos, porém os rendimentos máximos foram alcançados pelo método de Soxhlet usando etanol-água para as folhas e metanol para as flores. O extrato das folhas obtido por Soxhlet com etanol mostrou a maior AA e os extratos das flores obtidos por ESC e Soxhlet, ambos com etanol-água apresentaram o maior teor de compostos fenólicos e AA. Além disso, os extratos das folhas apresentaram ácidos graxos importantes como o γ -linolênico, oleico e linoleico. Os extratos das flores obtidos por ESC apresentaram melhores resultados frente as bactérias testadas e todos extratos das flores foram mais efetivos contra as bactérias gram-positivas e apresentaram halo de inibição para a bactéria *Listeria*. Pela combinação dos resultados, o extrato das folhas obtido por Soxhlet com etanol foi selecionado para a formação de partículas. No processo SFEE, a maior eficiência de encapsulação foi de 68,2 %, realizado a 9 MPa e vazão de emulsão de 1,5 mL/min. As análises mostraram que as partículas apresentaram característica amorfa, no formato de esferas e cápsulas, não houve degradação durante a encapsulação e o SFEE melhorou a preservação da AA das partículas em relação ao extrato bruto. Portanto, partículas dos extratos de folhas de yacon foram efetivamente formadas pelo SFEE.

Palavras-chave: Fluidos supercríticos. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana. Cromatografia gasosa. Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões.

ABSTRACT

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) belongs to the *Asteraceae* family and its cultivation was introduced in Brazil in 1980. The leaves are mainly used to produce teas due to its antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant properties. Usually its flowers and stems are discarded, requiring studies that demonstrate their potential for food and pharmaceutical industries. Thus, the aim of this work was to obtain extracts from yacon leaves and flowers through the Supercritical Fluid Extraction (SFE) and Soxhlet methods and the encapsulation of an extract by Supercritical Fluid Extraction of Emulsions (SFEE) process. Therefore, this study was divided into two parts. In the first one, the extraction methods were applied to the matrices evaluating their performance in terms of yield, total phenolic compounds, antioxidant activity (AA), antimicrobial potential and gas chromatography. The extraction methods used were: SFE with pure scCO₂ at 50 °C and 20 MPa, SFE with scCO₂ + ethanol at 30 – 70 °C, pressures 15 – 25 MPa, mass ratio (RM) 1:1 – 3:1 and Soxhlet with different solvents. Based on yields and biological activities an extract was selected to continue the work. In order to protect the extract and preserve its bioactivity, the second part of this study aimed at particle synthesis by the SFEE technique. The influence of SFEE pressure (9 – 13 MPa) and emulsion flow (0.5 – 1.5 mL/min) on encapsulation efficiency and ethyl acetate residual content was evaluated in the formation of particles of extract encapsulated with modified maize starch. Suspension stability, morphological and thermal characteristics and AA of the particles were also studied. The results showed good SFE performance in the recovery of the extracts, but the maximum yields were achieved by Soxhlet using ethanol-water for leaves and methanol for flowers. The leaf extract obtained by Soxhlet with ethanol showed the highest AA and the flowers extracts obtained by SFE and Soxhlet, both with ethanol-water showed the highest content of phenolic compounds and AA. In addition, the leaf extracts showed important fatty acids like γ -linolenic, oleic and linoleic. The flower extracts obtained by SFE presented better results against the tested bacteria and all flower extracts were more effective against gram-positive bacteria showing some inhibition halo for the *Listeria*. By combining the results, the leaf extract obtained by Soxhlet with ethanol was selected for particle formation. In the SFEE process, the highest encapsulation efficiency was 68.2 % at 9 MPa and 1.5 mL/min emulsion flow. The particles showed amorphous characteristics, in the form of spheres and capsules. Moreover, there was no degradation during encapsulation and SFEE improved the preservation of the AA in the particles when compared to the crude extract. Therefore, particles of yacon leaves extracts were effectively formed by SFEE.

Keywords: Supercritical fluids. Antioxidant activity. Antimicrobial activity. Gas chromatography. Supercritical fluid extraction of emulsions.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FOLHAS E FLOR DE YACON (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)	24
FIGURA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS QUANTO AO GRUPO ESTRUTURAL	29
FIGURA 3 – ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS.....	30
FIGURA 4 – DIAGRAMA PRESSÃO – TEMPERATURA PARA UM COMPONENTE PURO.....	35
FIGURA 5 – DIAGRAMA PARA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE MATRIZES SÓLIDAS.....	36
FIGURA 6 – TIPOS DE MICROCÁPSULAS	39
FIGURA 7 – ENCAPSULAÇÃO PELO MÉTODO SFEE	43
FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS E ANÁLISES QUE FORAM REALIZADAS NO DECORRER DO TRABALHO	46
FIGURA 9 – FOLHAS DE YACON <i>IN NATURA</i> (a), SECA (b) E SECA TRITURADA (c).....	47
FIGURA 10 - FLORES DE YACON <i>IN NATURA</i> (a), SECA (b) E SECA TRITURADA (c).....	47
FIGURA 11 – AGITADOR DE PENEIRAS	49
FIGURA 12 – EXTRATOR SOXHLET.....	51
FIGURA 13 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA UNIDADE DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA	53
FIGURA 14 – EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA	53
FIGURA 15 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO EQUIPAMENTO SFEE	62
FIGURA 16 – EQUIPAMENTO SFEE	63
FIGURA 17 – GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NO RENDIMENTO DAS FOLHAS DE YACON	73
FIGURA 18 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NO RENDIMENTO DAS FLORES DE YACON	73
FIGURA 19 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE RAZÃO MÁSSICA E TEMPERATURA NO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE YACON.....	75

FIGURA 20 - CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS PARA EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE YACON USANDO scCO_2 : ESC 0 (50 °C/ 20 MPA) E USANDO scCO_2 + ETANOL: ESC 1 (30 °C/ 15 MPA/ MR 1:1), ESC 2 (70 °C/ 15 MPA/ MR 1:1), ESC 3 (30 °C/ 25 MPA/ MR 1:1), ESC 4 (70 °C/ 25 MPA/ MR 1:1), ESC 9-11 (50 °C/ 20 MPA/ MR 2:1).....	76
FIGURA 21 - CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS PARA EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE YACON USANDO scCO_2 + ETANOL: ESC 5 (30 °C/ 15 MPA/ MR 3:1), ESC 6 (70 °C/ 15 MPA/ MR 3:1), ESC 7 (30 °C/ 25 MPA/ MR 3:1), ESC 8 (70 °C/ 25 MPA/ MR 3:1) E USANDO scCO_2 + ETANOL-ÁGUA: ESC 12 (30 °C/ 25 MPA/ MR 3:1), ESC 13 (70°C/ 25 MPA/ MR 3:1).....	77
FIGURA 22 - CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS PARA EXTRAÇÃO DE FLORES DE YACON USANDO scCO_2 : ESC 0 (50 °C/ 20 MPA) E scCO_2 + ETANOL: ESC 1 (30 °C/ 15 MPA/ MR 1:1), ESC 2 (70 °C/ 15 MPA/ MR 1:1), ESC 3 (30 °C/ 25 MPA/ MR 1:1), ESC 4 (70 °C/ 25 MPA/ MR 1:1), ESC 9-11 (50 °C/ 20 MPA/ MR 2:1).....	78
FIGURA 23 - CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS PARA EXTRAÇÃO DE FLORES DE YACON USANDO scCO_2 + ETANOL: ESC 5 (30 °C/ 15 MPA/ MR 3:1), ESC 6 (70 °C/ 15 MPA/ MR 3:1), ESC 7 (30 °C/ 25 MPA/ MR 3:1), ESC 8 (70 °C/ 25 MPA/ MR 3:1) E USANDO scCO_2 + ETANOL-ÁGUA: ESC 12 (30 °C/ 25 MPA/ MR 3:1), ESC 13 (70°C/ 25 MPA/ MR 3:1).....	78
FIGURA 24 – GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NO TFT DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON OBTIDOS USANDO scCO_2 + ETANOL	80
FIGURA 25 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NO TFT DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON OBTIDOS USANDO scCO_2 + ETANOL	81
FIGURA 26 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NO TFT DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON OBTIDOS USANDO scCO_2 + ETANOL	83
FIGURA 27 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NA AA DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON OBTIDOS USANDO scCO_2 + ETANOL	86

FIGURA 28 – GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NO ENSAIO ANTIOXIDANTE ABTS DOS EXTRATOS DE FOLHAS OBTIDOS USANDO SCCO ₂ + ETANOL	89
FIGURA 29 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NO ENSAIO ANTIOXIDANTE ABTS DOS EXTRATOS DE FLORES OBTIDOS USANDO SCCO ₂ + ETANOL	90
FIGURA 30 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE A RAZÃO MÁSSICA E TEMPERATURA NO ENSAIO ANTIOXIDANTE ABTS DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON OBTIDOS USANDO SCCO ₂ + ETANOL	91
FIGURA 31 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON OBTIDOS USANDO SCCO ₂ + ETANOL.....	92
FIGURA 32 – RELAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO. NÚMEROS DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO REFEREM-SE ÀS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO NA TAB. 19	96
FIGURA 33 – PLACA DE TESTE APRESENTANDO HALOS DE INIBIÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS NA CONDIÇÃO 9 (P5) E 12 (P6) PARA A BACTÉRIA <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	98
FIGURA 34 - PLACAS DE TESTE APRESENTANDO HALOS DE INIBIÇÃO: (A) EXTRATO 14 PARA A BACTÉRIA <i>SALMONELLA SP.</i> E (B) EXTRATO 7 (1) PARA A BACTÉRIA <i>S. AUREUS</i>	99
FIGURA 35 – DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO HIDRODINÂMICO DE GOTÍCULAS DA EMULSÃO PARA O ENSAIO 3 (9 MPA E 1,5 ML/MIN) (AS LINHAS REPRESENTAM A TRIPLICATA DA ANÁLISE).....	101
FIGURA 36 – AMOSTRAS DE PARTÍCULAS FORMADAS PELO PROCESSO SFEE: (A) SUSPENSÃO 3 E (B) SUSPENSÃO 3 SECA.....	102
FIGURA 37 – GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	103

FIGURA 38 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE PRESSÃO E VAZÃO DA EMULSÃO NA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	104
FIGURA 39 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS PARTÍCULAS SFEE: (A, B) ENSAIO 3 (9 MPA E 1,5 ML/MIN) E (C, D) ENSAIO 4 (13 MPA E 1,5 ML/MIN).....	107
FIGURA 40 – DIFRAÇÃO DE RAIOS -X DE HI-CAP NÃO PROCESSADO E PARTÍCULAS DO ENSAIO 3 (9 MPA E 1,5 ML/MIN).....	108
FIGURA 41 – DSC DO EXTRATO, AMIDO NÃO PROCESSADO, ENSAIO 1 (9 MPA E 0,5 ML/MIN), ENSAIO 2 (13 MPA E 0,5 ML/MIN), ENSAIO 3 (9 MPA E 1,5 ML/MIN), ENSAIO 4 (13 MPA E 1,5 ML/MIN, PONTO CENTRAL (11 MPA E 1,0 ML/MIN)	110
FIGURA 42 – FTIR DO EXTRATO DE FOLHAS DE YACON, AMIDO NÃO PROCESSADO, ENSAIO 1 (9 MPA E 0,5 ML/MIN), ENSAIO 2 (13 MPA E 0,5 ML/MIN), ENSAIO 3 (9 MPA E 1,5 ML/MIN), ENSAIO 4 (13 MPA E 1,5 ML/MIN, PONTO CENTRAL (11 MPA E 1,0 ML/MIN)	111
FIGURA 43 – CURVA ANALÍTICA DE ÁCIDO GÁLICO UTILIZADA NO CÁLCULO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON	134
FIGURA 44 – CURVA ANALÍTICA DE TROLOX UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON	135
FIGURA 45 – CURVA ANALÍTICA DE EXTRATO DE FOLHAS DE YACON UTILIZADA NO CÁLCULO DE EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS SUSPENSÕES	136
FIGURA 46 – CURVA ANALÍTICA UTILIZADA NO CÁLCULO DO TEOR RESIDUAL DE ACETATO DE ETILA	137

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO MINERAL DAS FOLHAS DESIDRATADAS DE YACON	24
TABELA 2 – MINERAIS PRESENTES EM FLORES DESIDRATADAS DE YACON	26
TABELA 3 – MÉTODOS UTILIZADOS PARA ANALISAR A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	30
TABELA 4 – FLUIDOS MAIS UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA	37
TABELA 5 – ÍNDICE DE POLARIDADE DOS SOLVENTES UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO EM SOXHLET	51
TABELA 6 – MATRIZ DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL $2^3 + 3$ PONTOS CENTRAIS USADO PARA EXTRAÇÃO USANDO $\text{SCCO}_2 + \text{ETANOL}$	54
TABELA 7 - MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL $2^2 + 3$ PONTOS CENTRAIS	61
TABELA 8 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RENDIMENTOS OBTIDOS NAS EXTRAÇÕES DE FOLHAS E FLORES DE YACON.....	70
TABELA 9 - ANOVA PARA O RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON USANDO $\text{SCCO}_2 + \text{ETANOL}$	74
TABELA 10 - ANOVA PARA O RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON USANDO $\text{SCCO}_2 + \text{ETANOL}$	75
TABELA 11 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAL (TFT), EXPRESSOS EM EQUIVALENTES DE ÁCIDO GÁLICO (GAE), PARA O EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON.....	80
TABELA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON USANDO $\text{SCCO}_2 + \text{ETANOL}$	82
TABELA 13 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON USANDO $\text{SCCO}_2 + \text{ETANOL}$	82
TABELA 14 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	85

TABELA 15 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON USANDO SCCO ₂ + ETANOL	87
TABELA 16 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	88
TABELA 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON USANDO SCCO ₂ + ETANOL	90
TABELA 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON USANDO SCCO ₂ + ETANOL	91
TABELA 19 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON	94
TABELA 20 – POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON	97
TABELA 21 - DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE DAS EMULSÕES	100
TABELA 22 – EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E TEOR RESIDUAL DE ACETATO DE ETILA DAS SUSPENSÕES	102
TABELA 23 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS SUSPENSÕES OBTIDAS POR SFEE.....	104
TABELA 24 – POTENCIAL ZETA DAS SUSPENSÕES OBTIDAS POR SFEE.....	105
TABELA 25 – ESTABILIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS PELO ENSAIO 3 POR 18 DIAS.....	112

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVO GERAL.....	21
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	YACON.....	22
2.1.1	Raízes	22
2.1.2	Folhas.....	23
2.1.3	Flores	25
2.2	ANTIOXIDANTES.....	26
2.2.1	Compostos fenólicos totais – Método Folin-Ciocalteu	31
2.2.2	Método DPPH.....	31
2.2.3	Método ABTS	32
2.3	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	32
2.3.1	Extração com solvente orgânico.....	33
2.3.2	Extração Supercrítica (ESC)	34
2.4	FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS	38
2.4.1	Formação de Partículas usando Fluidos Supercríticos	40
2.4.2	Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE)	42
2.5	CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE	44
3	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1	OBTENÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA	47
3.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS.....	48
3.3	CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULA DA EXTRAÇÃO SUPERCRTICA.....	48
3.3.1	Determinação do diâmetro médio de partículas	48
3.3.2	Determinação da densidade aparente do leito de partículas (ρ_a).....	49
3.3.3	Determinação da densidade real das partículas (ρ_r)	50

3.3.4	Porosidade do leito de ESC	50
3.4	EXTRAÇÃO EM SOXHLET	50
3.5	EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA	52
3.6	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS	55
3.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	56
3.7.1	Método DPPH.....	56
3.7.2	Método ABTS	57
3.8	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	58
3.9	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS.....	58
3.10	FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS	59
3.10.1	Formação das emulsões	60
3.10.2	Determinação do diâmetro hidrodinâmico (Dg) das gotículas das emulsões e do índice de polidispersividade (Pdl).....	60
3.10.3	Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE)	61
3.10.4	Eficiência de encapsulação (EE) do processo SFEE	64
3.10.5	Potencial Zeta (PZ) das suspensões.....	65
3.10.6	Morfologia e tamanho médio das partículas.....	65
3.10.7	Teor residual de acetato de etila das partículas	65
3.10.8	Difração de raios - X (PDRX) das partículas	66
3.10.9	Caracterização por calorimetria diferencial de varredura (DSC) das partículas.....	66
3.10.10	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das partículas.....	67
3.10.11	Estabilidade antioxidante das amostras encapsuladas	67
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS FORMADO PARA A ESC	69
4.2	RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES (X ₀).....	69
4.3	CURVAS DE EXTRAÇÃO	76
4.4	TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAL (TFT)	79
4.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA).....	84

4.5.1	Método do radical DPPH	84
4.5.2	Método do radical ABTS.....	87
4.6	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS	93
4.7	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	96
4.8	FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS	100
4.8.1	Determinação do diâmetro hidrodinâmico (Dg) das gotículas das emulsões e do índice de polidispersividade (Pdl).....	100
4.8.2	Eficiência de encapsulação (EE) e teor residual de acetato de etila (AE) 101	
4.8.3	Potencial zeta das suspensões	105
4.8.4	Morfologia e tamanho de partícula	106
4.8.5	Difração de raios - X (PDRX) das partículas	108
4.8.6	Caracterização por calorimetria diferencial de varredura (DSC) das partículas.....	109
4.8.7	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .	110
4.8.8	Estabilidade antioxidante das amostras encapsuladas	112
5	CONCLUSÃO	114
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	116
7	PRODUÇÃO TÉCNICA-CIENTÍFICA	117
7.1	ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS	117
7.2	TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS	117
	REFERÊNCIAS	119
	APÊNDICE 1 – CURVA ANALÍTICA DE ÁCIDO GÁLICO	134
	APÊNDICE 2 – CURVA ANALÍTICA DE TROLOX.....	135
	APÊNDICE 3 – CURVA ANALÍTICA DE EXTRATO DE FOLHAS DE YACON	136
	APÊNDICE 4 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO TEOR RESIDUAL DE ACETATO DE ETILA	137

1 INTRODUÇÃO

O yacon, espécie *Smallanthus sonchifolius* pertence à família Asteraceae e seu cultivo foi introduzido no final da década de 1980 no Brasil por imigrantes japoneses para a produção de chá, por causa das propriedades antidiabética das folhas (OLIVEIRA; NISHIMOTO, 2004).

A raiz de yacon é a principal parte da planta consumida, *in natura*, mas outros produtos têm sido desenvolvidos, tais como xarope, suco e chips (yacon cortado em lâminas desidratado). Diversos estudos sugerem que a raiz de yacon apresenta valor funcional pelo seu conteúdo de substâncias bioativas como os Frutooligossacarídeos (FOS), inulina e compostos fenólicos (GUSSO; MATTANNA; RICHARDS, 2015).

As folhas são utilizadas principalmente para a produção de chás, devido às diversas propriedades fitoquímicas, tais como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (VALENTOVÁ et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2013). As flores e os caules de yacon são descartados sem nenhum aproveitamento tecnológico quando suas raízes e as folhas são processadas, necessitando de estudos que demonstrem seus potenciais para as indústrias alimentícias e farmacêuticas. O aproveitamento das flores surge como uma alternativa para valorizar este resíduo.

Estudos sobre as propriedades fitoquímicas das flores de yacon e de extratos obtidos a partir destas estruturas são escassos na literatura. Apenas um artigo científico foi publicado sobre a utilização das flores como matéria-prima na produção de extratos biologicamente ativos. Segundo Andrade et al. (2014), os extratos de flores de yacon possuem ácidos graxos, flavonoides e ácidos fenólicos. Extratos de folhas de yacon foram obtidos por diferentes métodos de extração, tais como extração Soxhlet com solventes metanol e acetato de etila, infusão e decocção com água, maceração com solvente metanol, ultrassom com solvente etanol e extração em fase sólida (AYBAR et al., 2001; LIN et al., 2003; ADAM et al., 2005; SIMONOVSKA et al., 2003; BARCELLONA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; PARK e HAN, 2013).

A qualidade dos extratos naturais está relacionada com sua composição, e consequentemente, com a sua atividade biológica, e é intensamente dependente da

técnica de extração empregada, do solvente utilizado, da origem da matéria-prima, sua condição de armazenamento e pré-tratamento aplicado (MOURE et al., 2001; LOULI; RAGOUSSIS; MAGOULAS, 2004). Então, métodos alternativos para obtenção de substâncias bioativas, como extração com fluidos supercríticos, tem sido estudados.

A extração supercrítica (ESC) emprega gases pressurizados como solventes e se destaca por possibilitar a obtenção de extratos isentos de solvente (tecnologia limpa) e reduzida degradação térmica, além de possibilitar o fácil controle da seletividade do processo para um grupo específico de compostos a serem extraídos através do ajuste de parâmetros como pressão e temperatura (DANIELSKI et al., 2005; KITZBERGER et al., 2007).

Nos extratos obtidos a partir de folhas e flores de yacon, estão presentes substâncias com reconhecidas atividades biológicas e que necessitam de proteção, uma vez que podem ser degradadas quando expostas à luz ou oxigênio. Sendo assim, torna-se necessária a investigação de técnicas que preservem a integridade destes compostos frente à degradação, tais como a encapsulação. A encapsulação previne a perda de compostos voláteis, mascara sabores e odores indesejáveis e favorece a solubilidade de compostos hidrofóbicos em meios hidrofílicos, o que amplia sua gama de aplicação, uma vez que na indústria alimentícia a inclusão de compostos bioativos lipofílicos para o desenvolvimento de alimentos “saudáveis” é uma das maiores dificuldades a ser superada (GOMES et al., 2011).

Existem várias técnicas potencialmente úteis para a precipitação de partículas poliméricas biodegradáveis. As características físicas das partículas (morfologia, tamanho e distribuição do tamanho das partículas) são afetadas pela técnica utilizada, bem como pelas condições do processo que incluem massa molecular do polímero, compostos ativos a serem encapsulados, solventes e outros componentes (surfatantes) utilizados, temperatura e pressão, entre outros (CRUZ et al., 2019).

Atualmente, o uso de fluidos pressurizados na obtenção de partículas utilizadas para a encapsulação de principais ativos em matrizes poliméricas tem sido fonte de pesquisa em diversos setores industriais e acadêmicos. Esses fluidos, no estado sub ou supercrítico, fornecem partículas na ordem nano ou micrométrica, com estreita distribuição de tamanho bem como altas porcentagens de encapsulação (MEZZOMO e FERREIRA, 2016). Segundo Oliveira et al. (2017)

várias vantagens derivadas do uso de fluidos supercríticos, dependendo da configuração do processo, podem ser citadas como alta pureza dos produtos, controle do polimorfismo dos cristais, possibilidade de processar estágio único sensível e ambientalmente aceitável. Diversas técnicas baseadas em fluidos supercríticos têm sido propostas para explorar as características de manuseio do poder solvente e alta difusividade que são peculiares aos fluidos próximos ao ponto crítico (MEZZOMO e FERREIRA, 2016).

Estudos mostram que o processo conhecido como Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE) é uma tecnologia promissora para produzir partículas de substâncias naturais usando fluidos supercríticos em combinação com emulsões. Este processo consiste na extração do solvente orgânico das gotículas de uma emulsão pelo scCO_2 e apresenta vantagens sobre a técnica Antisolvente Supercrítico (SAS) convencional, como a possibilidade de regular o tamanho das partículas através das características geométricas das fases da emulsão, alcançando a ordem nanométrica (MATTEA et al., 2009; MEZZOMO et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

A motivação para o presente estudo foi baseada no potencial dos extratos de folhas e flores de yacon e na falta de dados na literatura até o presente momento sobre a extração e encapsulamento desses extratos usando fluidos supercríticos.

Assim, frente ao exposto, faz-se necessária a investigação e avaliação de tecnologias que possibilitem a obtenção e o aproveitamento de extratos com qualidade biológica oriundos de folhas e flores de yacon. Neste trabalho foram realizadas extração a baixas e altas pressões para a obtenção dos extratos de ambas as matérias-primas em estudo, e ainda a encapsulação de um extrato selecionado.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi a obtenção de extratos naturais a partir das folhas e flores de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) pelos processos de extração por fluido supercrítico e Soxhlet e a encapsulação do extrato selecionado.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar o rendimento de extração por meio da técnica de Soxhlet com solventes orgânicos de diferentes polaridades e da extração supercrítica com scCO₂, scCO₂ + cossolvente (etanol e etanol-água);
- b) Determinar as condições de operação (temperatura, pressão e razão mássica) que maximizam o rendimento em extrato na extração supercrítica;
- c) Determinar as curvas cinéticas de extração supercrítica;
- d) Determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais dos extratos de folhas e flores de yacon;
- e) Analisar a atividade antioxidante dos extratos de folhas e flores de yacon;
- f) Analisar a atividade antimicrobiana dos extratos de flores de yacon;
- g) Identificar e comparar o perfil de ácidos graxos dos extratos das folhas e os compostos voláteis das flores de yacon;
- h) Encapsular o extrato selecionado em polímero amido de milho modificado (Hi-Cap) pela tecnologia SFEE;
- i) Estudar os efeitos das variáveis (pressão e vazão de emulsão) do processo SFEE na eficiência de encapsulamento e remoção do solvente orgânico;
- j) Avaliar as características das partículas formadas em termos de tamanho, morfologia e perfil térmico;
- k) Verificar a estabilidade das suspensões oriundas do processo SFEE;
- l) Avaliar a estabilidade antioxidante das partículas obtidas por SFEE.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 YACON

O yacon é uma espécie pertencente à família *Asteraceae* sendo denominado na literatura científica de *Smallanthus sonchifolius*, originário da região andina e introduzida no Brasil por descendentes japoneses por volta de 1989. Inicialmente foi classificada como pertencente ao gênero *Polymnia* sp. porém, em 1978, uma perspectiva diferente foi adotada propondo a denominação *Smallanthus*, que englobou todas as espécies sul-americanas e da América central. Em meados dos anos 2000, teve início o consumo expressivo dessa raiz, tornando-se conhecida popularmente como batata yacon ou batata *diet* (GUSSO; MATTANNA; RICHARDS, 2015).

Yacon é o nome comumente utilizada para designar a planta e a sua raiz de reserva. A raiz tuberosa tem recebido nomes diferentes nos idiomas andinos dominantes (Quéchuá e Aymara). Na língua Quéchuá o yacon é conhecido por Aricoma e aricama, Na língua Aymara, são utilizados os termos Llaqon, llacum, llacuma ou yacumpi. No Equador os nomes populares da espécie são jicama, chicama, shicama, jiquima ou jiquimilla. Na Colômbia é conhecido por arboloco. A espécie também recebeu nomes em idiomas europeus como: poire de terre (França), yacon strawberry (Estados Unidos), leafcup e yacón (Inglaterra), polymnia (Itália). De maneira geral o termo yacon é o mais utilizado, principalmente em países como Colômbia, Peru, Argentina, países europeus, Japão, Nova Zelândia e Brasil (GRAU; REA, 1997).

2.1.1 Raízes

O termo alimento funcional refere-se aos alimentos ou nutrientes cuja ingestão leva a importantes mudanças fisiológicas ao organismo, isoladas ou distintas daquelas associadas ao seu papel como nutriente. Com base em sua composição, surge a hipótese de que a raiz de yacon pode ser considerada um alimento funcional pelo seu conteúdo de substâncias bioativas, como os

Frutooligossacarídeos (FOS), inulina e compostos fenólicos (GUSSO; MATTANNA; RICHARDS, 2015).

Os FOS são quimicamente formados por uma molécula de glicose ligada em duas a dez moléculas de frutose. As ligações entre as moléculas são resistentes à hidrólise enzimática do sistema digestivo humano, reduzindo drasticamente o valor calórico deste carboidrato (MARIQUE; PÁRRAGA; HERMANN, 2003).

Quando ingeridos pelo homem, os frutanos atingem o cólon, onde são fermentados pela microbiota, composta principalmente de bifidobactérias. Pela ação dessas bactérias, são liberados ácidos graxos de cadeia curta como ácido acético, propiônico e butírico. Com a produção de ácidos, é facilitada a absorção de cálcio, ferro e magnésio (WANG; GIBSON, 1993).

No Brasil, de todos os benefícios atribuídos à raiz, a maior importância refere-se à redução da glicemia e ao auxílio na redução da obesidade, mas além disso, estudos sugerem que os FOS e a inulina presentes na raiz de yacon, podem atuar na inibição dos estágios iniciais do câncer de cólon, reduzir os níveis de colesterol, diminuir a pressão arterial, reduzir a glicose no sangue e melhorar a regularização da função intestinal (ROBERFROID, 1995; AYBAR et al., 2001; GIBSON; GUIGOZ et al., 2002; PEREIRA; GIBSON, 2002; COUNDRAY et al., 2003; ALBUQUERQUE; ROLIM, 2011; DE MOURA et al., 2012; LOBO et al., 2011).

2.1.2 Folhas

As folhas frescas de yacon são constituídas de 80% de água (FIGURA 1). Após o processo de secagem, as mesmas apresentam alto teor de fibra alimentar (44,15 g/100g) e proteínas (17,88 g/100g) (Andrade, 2014). Os minerais encontrados nas folhas desidratadas de yacon são apresentados na TABELA 1.

Os benefícios atribuídos às folhas do yacon, tais como potencial antimicrobiano, atividade anti-inflamatória e antioxidante estão relacionados com a sua composição e foram encontradas diversas pesquisas mostrando os componentes presentes nos óleos essenciais e extratos naturais dessa matriz. Adam et al. (2005) analisaram os óleos essenciais das folhas do yacon e identificaram o β -pineno, cariofileno e γ -cardineno como os principais componentes. Andrade (2014) analisou o perfil de ácidos graxos das folhas desidratadas e encontraram 19 ácidos

graxos. Sendo os predominantes o ácido palmítico, ácido linoleico (ômega 6), ácido linolênico (ômega 3), ácido oleico (ômega 9) e esteárico.

FIGURA 1 – FOLHAS E FLOR DE YACON (*SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS*)



FONTE: A autora (2019).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO MINERAL DAS FOLHAS DESIDRATADAS DE YACON

ELEMENTO	A (mg/kg)	B (mg/100g)
Bário	7,98	x
Cálcio	16833,28	1805
Cádmio	0,07	x
Cobre	10,37	<0,5
Ferro	130,31	7,29
Magnésio	9118,48	x
Manganês	42,43	<0,5
Fósforo	2913,32	543
Estanho	0,42	x
Zinco	x	2,93

A= ANDRADE (2014), B = VALENTOVÁ; ULRICHOVÁ (2003), x= NÃO DETERMINADO.

Melanpolideos antifúngicos foram isolados e identificados de extratos de folhas de yacon (INOUE et al., 1995). Lin, Hasegawa e Kodama (2003) encontraram seis lactonas sesquiterpênicas pertencentes à classe do melanpolideos: enidrina, uvedalina, sonchifolina, flutuctinina, os ésteres metílico do ácido 8 β -tigloyloxymelampolid-14-óico e o 8 β -metacrililoximelampolid-14-óico. Todas as 6 lactonas sesquiterpênicas apresentaram atividade antibacteriana contra o *Bacillus subtilis* e atividade antifúngica contra *Pyricularia oryzae*.

Andrade (2014) analisou lactonas sesquiterpênicas das folhas e revelou a presença de enidrina e uvedalina em uma proporção de 3:1. Essas lactonas apresentaram atividade antibacteriana contra o *Staphylococcus aureus*, apresentando concentração inibitória mínima de 750 µg/ml.

Diferentes compostos fenólicos foram identificados nos extratos dessas folhas, tais como: o ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido clorogênico, ácido caféico e ácido ferrúlico. Os flavonoides: rutina e miricetina, e substâncias diterpenoides também foram encontradas (SIMONOVSKA et al., 2003; VALENTOVÁ; ULRICHOVÁ, 2003; ANDRADE et al., 2014).

Andrade et al. (2014) analisaram a atividade antioxidante dos extratos obtidos das folhas de yacon por diferentes métodos de extração e relataram uma alta atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS nos extratos obtidos por decocção e infusão em água, respectivamente. Essa atividade antioxidante mostrou estar relacionada com os compostos fenólicos presentes nos extratos.

2.1.3 Flores

Muitos estudos são reportados comprovando o potencial de flores de plantas pertencentes a diversas famílias como fonte de compostos fenólicos e a família *Asteraceae* pode ser considerada uma das mais importantes fontes de espécies vegetais de interesse terapêutico, dado o grande número de plantas desta família que são usadas popularmente como remédios, muitas das quais amplamente estudadas dos pontos de vista químico e farmacológico (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Apesar disso, são escassos estudos relacionados às propriedades das flores de yacon e elas são utilizadas como forragem para rebanhos devido à sua importante carga proteica (OLIVEIRA et al., 2011).

Na pesquisa desenvolvida por Andrade (2014) em flores desidratadas de yacon foram identificados a presença de 16 ácidos graxos, sendo que os principais representantes são: ácido linoleico (ômega 6), palmítico, linolênico (ômega 3), esteárico e oleico (ômega 9). As flores de yacon desidratadas apresentaram como constituintes principais: fibra alimentar (38,16 g/100g), carboidrato (30,23 g/100g) e proteínas (12,20 g/100g) (ANDRADE, 2014). Os minerais encontrados nas mesmas são apresentados na TABELA 2.

TABELA 2 – MINERAIS PRESENTES EM FLORES DESIDRATADAS DE YACON

ELEMENTO	FLOR DE YACON (mg/kg)
Bário	4,49
Cálcio	6180,70
Cádmio	0,07
Cobre	9,9
Ferro	38,05
Magnésio	3992,74
Manganês	23,11
Fósforo	3127,66

FONTE: ANDRADE (2014).

Andrade et al. (2014) avaliaram os extratos aquosos e metanólicos de flores de yacon e observaram a presença de compostos fenólicos e flavonoides. A presença destes compostos, em extratos provenientes de vegetais, sugere um grande poder antioxidante a estes extratos (LOTITO; FREI, 2004; SUN et al., 2011). Os principais compostos fenólicos encontrados foram o ácido gálico, cafeico e ferrúlico e os flavonoides predominantes foram a rutina e a miricetina.

ANDRADE et al. (2014) analisaram a atividade antioxidante dos extratos obtidos das flores de yacon por diferentes métodos de extração e relataram uma alta atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS nos extratos obtidos por infusão em água. Essa atividade antioxidante mostrou também estar relacionada com os compostos fenólicos presentes nos extratos.

Dessa forma, é evidente a importância da espécie *Smallanthus sonchifolius* e do conhecimento da composição química das plantas para a confirmação da presença dos princípios ativos e viabilização de sua aplicação, tanto em alimentos como medicamentos (CARDOSO et al., 2008).

2.2 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes atuam como protetores da oxidação de biomoléculas por radicais livres e impedem a propagação da reação em cadeia provocada pelos mesmos. Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que presentes, em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou previnem a oxidação deste substrato (FANG et al., 2002).

Radical livre é uma molécula ou fragmento molecular que contém um ou mais elétrons desemparelhados em uma órbita externa. Segundo Barreiros (2006) esta configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, de meia-vida curta e quimicamente muito reativas. Eles podem ser gerados por fontes exógenas ou endógenas. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabagismo, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002). Por fontes endógenas, originam-se de processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, tais como: redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, ciclooxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons. Esta geração de radicais livres envolve várias organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas (MACHLIN; BENDICH, 1987).

Existem evidências numerosas sobre o papel dos radicais livres em uma série de condições patológicas, incluindo envelhecimento, câncer, esclerose múltipla e doenças cardiovasculares. (ROBERTS; SINDHU, 2009; TARKO et al., 2009). Já em produtos alimentícios os radicais livres podem atacar ligações insaturadas de moléculas lipídicas, proteínas, carboidratos e nucleotídeos, causando o desenvolvimento de rancidez, *off-flavors* (sabores residuais), e perda de valor nutritivo e de vida de prateleira dos produtos (LOULI; RAGOUSSIS; MAGOULAS, 2004).

O sistema de defesa antioxidante pode atuar por meio de quatro mecanismos. O primeiro é através de reações catalíticas com a participação de enzimas, antioxidantes endógenos, como a catalase, superóxido dismutase e peroxidase. Nessas reações, selênio, zinco, cobre e manganês atuam como cofatores enzimáticos. Um exemplo desse mecanismo é a conversão de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, com participação da catalase. O segundo mecanismo é através da ligação de proteínas como a transferrina e a ceruloplasmina aos íons férrico e cúprico, respectivamente, que são íons pró-oxidantes. Essas reações enzimáticas contribuem para redução da concentração de radicais livres e resultam na redução das reações de iniciação e fazem parte do sistema de defesa antioxidante primário. O terceiro se refere à proteção realizada por *heat shock* proteínas às macromoléculas em situações de estresse e o último mecanismo é a capacidade que as substâncias antioxidantes, adquiridas pela alimentação, como as

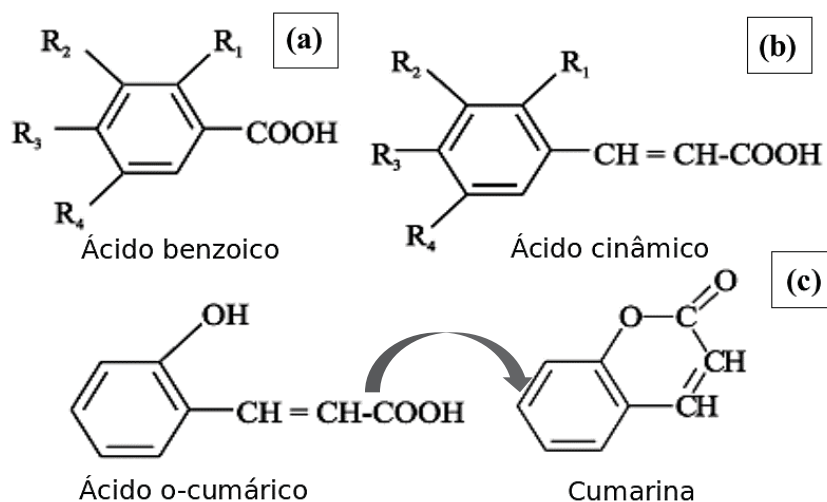
vitaminas C e E (α -tocoferol), compostos fenólicos têm de doar elétrons aos radicais, neutralizando-os (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009). Esses antioxidantes interrompem a etapa de propagação da oxidação e por isso fazem parte do sistema de defesa secundário (WICKENS, 2001).

Segundo Valtueña et al. (2008), para aumentar a capacidade de defesa do sistema antioxidante é necessário o consumo de alimentos que contenham substâncias com capacidade antioxidante, de forma que uma alimentação com hortaliças, frutas, grãos e cereais integrais possam fornecer nutrientes e compostos bioativos que irão atuar em conjunto com os antioxidantes enzimáticos a fim de minimizar os efeitos prejudiciais provocados pelo estresse oxidativo.

Os compostos fenólicos são considerados os componentes antioxidantes mais importantes presentes em especiarias e em outros materiais derivados das plantas, e existe uma grande correlação entre a concentração de fenólicos e a capacidade antioxidante total (VALTUEÑA et al., 2008). Estruturalmente eles compreendem de um anel aromático, tendo um ou mais substituintes hidroxila, e vão desde simples moléculas fenólicas a compostos altamente polimerizados. A atividade antioxidante destes compostos depende da sua estrutura, particularmente do número e da posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos. Eles são divididos em três grupos; o primeiro é composto pelos ácidos benzoicos, que possuem sete átomos de carbono (C6 – C1) (FIGURA 2a). O segundo grupo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6 – C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal (FIGURA 2b). O terceiro grupo é formado pelas cumarinas, que são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (FIGURA 2c) (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os grupos hidroxilas presentes nas estruturas dos compostos fenólicos constituem a base de sua capacidade antioxidante, atuam como agentes redutores em virtude de sua habilidade de doar o hidrogênio para o radical livre, estabilizando-o. A transferência do hidrogênio para o radical livre interrompe a reação de oxidação e o radical fenox resultante é estabilizado por ressonância (BOAVENTURA et al., 2012).

FIGURA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS QUANTO AO GRUPO ESTRUTURAL



FONTE: Adaptado de RAMALHO e JORGE, 2006.

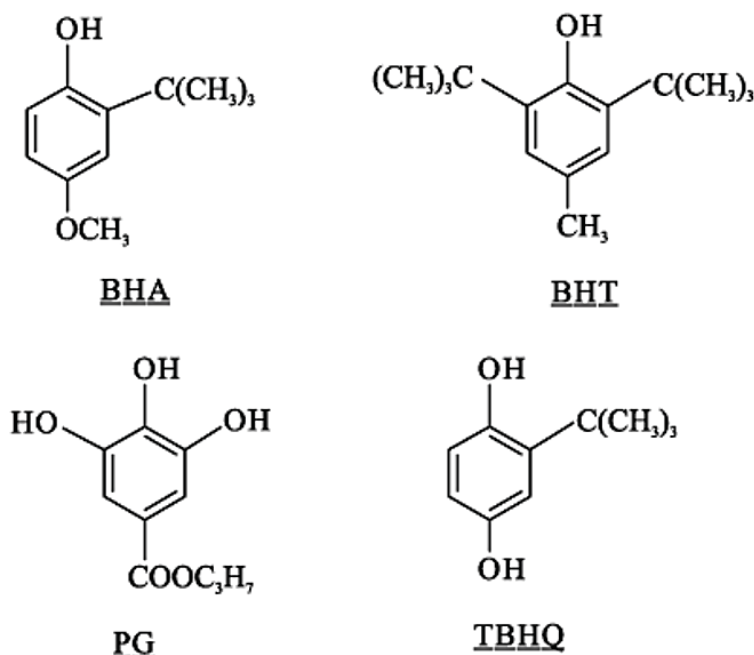
Estudos têm demonstrado, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, a habilidade dos compostos fenólicos em modular a atividade de certas enzimas, devido à capacidade que certos compostos fenólicos possuem de se ligar às proteínas, bem como a atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, os efeitos vaso protetores, hiperglicêmicos e a atividade anti-obesidade apresentada por esses compostos (CHO et al., 2010; BOAVENTURA et al., 2012; DAGLIA, 2012).

A indústria de alimentos utiliza antioxidantes sintéticos para inibir os processos oxidativos em alimentos lipídicos. Esses são compostos fenólicos com substituições variadas no anel (FIGURA 3) que contribuem para inibir alterações indesejáveis no alimento. No entanto, existe uma demanda por estudos sobre a extração e viabilidade comercial de antioxidantes naturais, uma vez que, os antioxidantes sintéticos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade (RAMALHO; JORGE, 2006).

Frente à diversidade da estrutura química dos compostos antioxidantes e de seus mecanismos de ação, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliar a atividade antioxidante de diferentes amostras. Em todos esses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, normalmente para produzir cor, fluorescência, quimiluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR ("Electron Spin Resonance" ou Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança mensurável. A presença de

antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa (DAGLIA, 2012).

FIGURA 3 – ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS



BHA: BUTILHIDROXIÂNISOL; BHT: BUTILHIDROXITOLUENO; PG: PROPIL GALATO; TBHQ: TERC-BUTIL-HIDROQUINONA. FONTE: RAMALHO e JORGE (2006).

Baseado nas reações químicas envolvidas, os principais métodos usados para medir a atividade antioxidante podem ser divididos em duas categorias, conforme mostrado na TABELA 3.

TABELA 3 – MÉTODOS UTILIZADOS PARA ANALISAR A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

CATEGORIAS	MECANISMO	MÉTODOS
1	Transferência de elétrons	FRAP ⁽¹⁾
	Sequestro de radicais livres	DPPH ⁽²⁾
		ABTS ⁽³⁾
2	Reação de transferência de átomos de H	ORAC ⁽⁴⁾ β-caroteno/linoleato

⁽¹⁾ POTECIAL ANTIOXIDANTE DE REDUÇÃO FÉRRICA; ⁽²⁾ 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL; ⁽³⁾ 2,2'-AZINO-BIS ((3-ETILBENZOTIAZOLINA-6-ÁCIDO SULFÔNICO); ⁽⁴⁾ CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO).

Nestes métodos, a atividade antioxidante pode ser medida em diferentes fases da oxidação, porém nenhum ensaio isolado irá refletir totalmente a atividade antioxidante da amostra. Diante disso, faz-se a utilização de duas ou mais técnicas que forneçam informações sobre a interferência antioxidante em diferentes fases de dano oxidativo (HU; SKIBSTED, 2002; PRIOR; CAO, 1999).

2.2.1 Compostos fenólicos totais – Método Folin-Ciocalteu

Folin-Ciocalteu é o método mais utilizado na determinação de compostos fenólicos em extratos naturais e ele se fundamenta no caráter redutor desses fenólicos (STRATIL; KLEJDUS; KUBÁŇ, 2007). O reagente Folin-Ciocalteu consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstístico, onde molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6⁺. Quando esse reagente é posto em contato com os compostos fenólicos (agentes redutores) resulta na formação de um radical superóxido (O_2^-), o qual reage com o molibdato formando óxido de molibdênio (MoO_4^{+}), de coloração azul. São feitas medidas espectrofotométricas a 765 nm e a coloração azul permite a determinação do conteúdo de fenólicos totais nos extratos (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

2.2.2 Método DPPH

Esse método é um dos mais utilizados para a avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais, devido à sua facilidade, precisão e reprodutibilidade. O DPPH é um radical livre, estável em solução, apresentando coloração violeta em metanol ou etanol. O teste é um método espectrofotométrico e se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante. Essa reação resulta na redução do DPPH à DPPH-H, ocasionando a mudança da cor violeta para o amarelo pálido lida nos comprimentos de onda de 515 -518 nm (ROGINSKY; LISSI, 2005).

O método DPPH foi aplicado para a determinação da atividade antioxidante por Czaikoski et al. (2015) em extratos obtidos por extração supercrítica de flores da

mesma família do yacon. Além desse, Souza et al. (2018) encontraram resultados satisfatórios para a atividade antioxidante pelo mesmo método em extratos de folhas também da mesma família do yacon.

2.2.3 Método ABTS

Esse método é utilizado para a análise antioxidante de compostos hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais. Esse ensaio está baseado na redução do ABTS^{•+} a ABTS pela ação de um composto antioxidante, ocasionando a perda da coloração azul esverdeada do meio reacional. A porcentagem de inibição ABTS^{•+} é determinada em função do Trolox, um antioxidante padrão submetido às mesmas condições de análise da amostra estudada (SUCUPIRA et al., 2014).

Andrade et al. (2014) estudaram os extratos das folhas e flores do yacon obtidos por infusão, decocção e em Soxhlet com metanol e os mesmos apresentaram boa atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS. Essa atividade foi atribuída à presença de compostos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos.

2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A extração é uma operação unitária que tem por objetivo a separação de determinadas substâncias a partir de diversas matrizes, sólidas ou líquidas, através de processos químicos ou físicos (EGGERS; JAEGER, 2003). A palavra é derivada do latim “*extrahere*”, que significa separação seletiva em que se retém uma das fases, o extrato, e despreza outra, o resíduo.

Os extratos naturais de plantas possuem alto valor agregado, pois são constituídos de uma mistura complexa de substâncias, muitas delas termosensíveis. A qualidade dos extratos está relacionada com sua composição, e consequentemente, com a sua atividade biológica, e é intensamente dependente da técnica de extração empregada e do solvente utilizado (MOURE et al., 2001; LOULI; RAGOUSSIS; MAGOULAS, 2004).

Há diversos métodos para a extração dos compostos bioativos de matrizes vegetais. Dentre esses, estão os processos de extração à baixa pressão, como Soxhlet, hidrodestilação, ultrassom e maceração que utilizam normalmente solventes orgânicos, e métodos alternativos vem sendo cada vez mais utilizados e estudados, como a extração com fluido supercrítico, fluido subcrítico e extração com líquidos pressurizados.

Estudos têm mostrado a necessidade de redução de solventes orgânicos (hexano, metanol, cloreto de metileno), que devido à sua toxicidade têm efeitos indesejáveis no ambiente e na qualidade e segurança dos alimentos e outros produtos finais. Por esse motivo, tecnologias de extração que usam solventes não-tóxicos (tais como água, dióxido de carbono e etanol) estão sendo introduzidas e aplicadas para a extração de vários materiais e compostos (BUBALO et al., 2018).

2.3.1 Extração com solvente orgânico

Segundo Andreo e Jorge (2006) a extração por solvente é um dos mais antigos métodos de separação conhecido e mais utilizados nas indústrias de alimentos para a obtenção de compostos bioativos.

As técnicas à baixa pressão são geralmente aplicadas nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia para a obtenção de diversos extratos e podem utilizar uma ampla variedade de solventes, como hexano, etanol, éter de petróleo, metanol, clorofórmio, acetonitrila e acetato de etila, podendo ser utilizados puros ou em misturas com diferentes proporções de água. No entanto, alguns desses solventes são nocivos para os seres humanos e perigosos para o meio ambiente e devem ser utilizados com cuidado (MEZZOMO, 2008; PESSOA et al., 2015).

A técnica mais tradicional de extração com solventes orgânicos é a de Soxhlet, que foi desenvolvida em 1879 por Franz von Soxhlet e foi originalmente desenvolvido para a extração de lipídeos de um material sólido e vem sendo considerada padrão a mais um século (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Segundo Brum et al. (2009) as principais vantagens que o método de Soxhlet apresenta são: a amostra está sempre em contato com o solvente, havendo sua constante renovação; a temperatura do sistema mantém-se relativamente alta, visto que o calor aplicado para o processo de evaporação é constante; é uma

metodologia muito simples que não requer treinamento especializado e que possibilita a extração de uma quantidade maior de óleo em relação a outros métodos, sem a necessidade de filtração da miscela após o término da extração, pois a amostra permanece envolta no cartucho durante todo o procedimento.

Castro e Priego–Capote (2010) destacam como desvantagens sendo: o longo tempo de processo, que pode variar de 1 h a 72 h; a elevada quantidade de solvente empregada, necessitando de uma etapa posterior de eliminação do solvente após a extração, o que exige grande dispêndio de energia, e ainda torna-se um problema ambiental pelo descarte inadequado dos resíduos; e o risco da decomposição térmica dos compostos extraídos, já que, durante a extração, o balão que contém o solvente e os compostos já solubilizados é mantido na temperatura de ebulição do solvente.

2.3.2 Extração Supercrítica (ESC)

Em todo o mundo há um consenso para as indústrias adotarem novos processos sustentáveis que não requeiram o uso de solventes orgânicos prejudiciais ao ambiente, por essa razão, a extração a alta pressão em que usa solventes não-tóxicos (tais como água, dióxido de carbono e etanol) vem ganhando espaço em processos industriais nas últimas décadas (BUBALO et al., 2018). A ESC utiliza solventes no estado supercrítico e se destaca por representar uma tecnologia que permite a obtenção de extratos de alta qualidade e que minimiza impactos ao meio ambiente, devido à ausência de solvente no produto final.

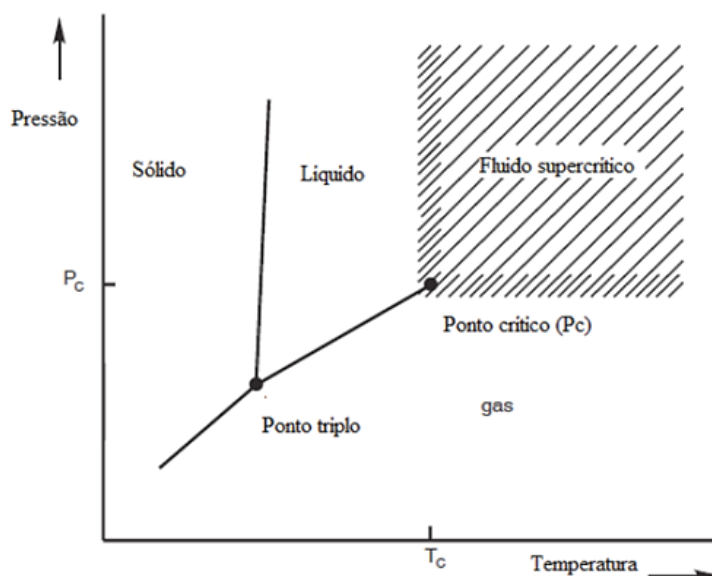
Um solvente puro se encontra no estado supercrítico quando sua pressão e temperatura estão acima dos valores críticos (FIGURA 4). A temperatura crítica (T_c) é a temperatura mais alta, na qual o gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão e a pressão crítica (P_c) é a pressão mais elevada, na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura do líquido. A especial combinação da difusividade e viscosidade similar ao dos gases, e as propriedades de solvatação e densidade similares aos líquidos, faz deles excelentes solventes para várias aplicações.

Os fluidos supercríticos foram descobertos em 1822 por Baron Charles Cagniard La Tour durante a realização de experimentos envolvendo vários líquidos

aquecidos e uma bala de canhão em um barril de canhão selado. Os fluidos supercríticos também podem ocorrer na natureza, por exemplo, a água supercrítica é formada em alguns vulcões submarinos, devido a alta pressão da água e temperatura de erupção vulcânica (KNEZ, et al., 2014).

As aplicações da ESC na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos são inúmeras. Alguns exemplos de processos consolidados que utilizam a extração com fluido pressurizado são a remoção de nicotina do tabaco e de cafeína do café e chás, extração de aromas, óleos essenciais e antioxidantes, extração de óleos de sementes oleaginosas, extração de ervas medicinais e produção de extrato de lúpulo para a produção de cervejas (GÓMEZ; OSSA, 2002; PEREIRA et al., 2004; PESSOA et al., 2015).

FIGURA 4 – DIAGRAMA PRESSÃO – TEMPERATURA PARA UM COMPONENTE PURO



FONTE: MUKHOPADHYAY (2000).

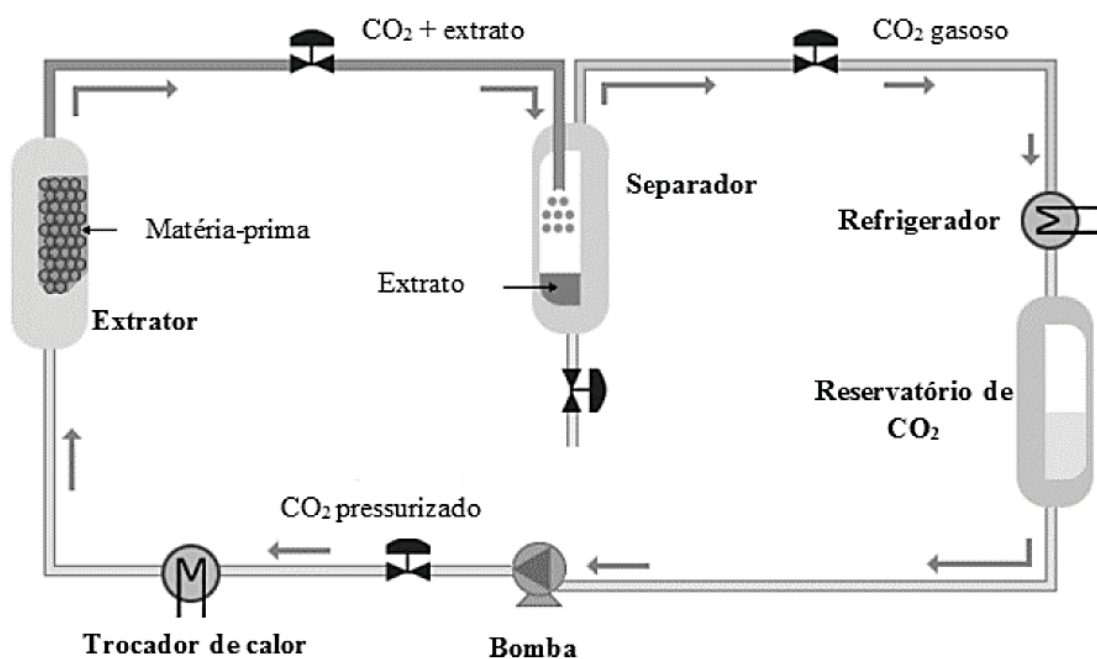
Quando é utilizado somente o solvente supercrítico na ESC, o único resíduo acumulado ao final do processo é o sólido do qual foi extraído o soluto. Como a matéria-prima é uma matriz biológica, o resíduo pode ser incorporado ao solo sem prejuízo ao meio ambiente. Em alguns casos, como na extração da cafeína do café, tanto o resíduo (grãos de café decafeinados) quanto o extrato (cafeína) são produtos comercializáveis (MUKHOPADHYAY, 2000).

Os processos envolvendo fluidos supercríticos são sustentáveis, ecologicamente corretos, e oferecem possibilidade de obtenção de novos produtos.

Sua principal vantagem reside na possibilidade de separação e secagem de produtos por expansão simples, enquanto o gás pode ser recuperado, reciclado e reutilizado sem a necessidade da etapa de purificação. Os benefícios são evidentes no uso dos mais importantes fluidos supercríticos: scCO_2 e scW (água supercrítica). Eles não são carcinogênicos, tóxicos, mutagênicos, inflamáveis e são considerados termodinamicamente estáveis. Outro maior benefício é referente a possibilidade de ajustar as propriedades termofísicas dos fluidos supercríticos, tais como a difusividade, viscosidade, densidade ou constante dielétrica, pela simples variação da pressão e temperatura (BRUNNER, 2010; KNEZ, et al., 2014).

A extração de matrizes sólidas com fluido supercrítico, consiste, basicamente, de duas etapas: extração e separação da mistura soluto/solvente (FIGURA 5).

FIGURA 5 – DIAGRAMA PARA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE MATRIZES SÓLIDAS



FONTE: SUFLUX (2014).

Durante a extração, o solvente supercrítico escoia através de um leito fixo formado por uma matriz sólida (extrator), solubilizando os componentes presentes no sólido. Conforme o solvente escoia através do material vegetal, ocorre a transferência de massa do soluto da fase sólida para a fase fluída e, em qualquer ponto dentro do extrator, a concentração de óleo a ser extraído varia continuamente em cada fase até que o equilíbrio seja alcançado. Ou seja, a força motriz para a

transferência de massa no processo é o equilíbrio da concentração de solutos entre as fases sólida e fluida (BRUNNER, 1994; MICHIELIN, 2009).

O principal solvente supercrítico utilizado é o CO₂ (condições críticas = 31 °C e 72,85 bar). Ele é barato, ambientalmente aceito e geralmente reconhecido como seguro pela Food and Drug Administration (FDA) e pela autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (AES). A TABELA 4 apresenta uma lista dos fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica, e os valores de temperatura e pressão críticas e densidade.

TABELA 4 – FLUIDOS MAIS UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

TIPO DE FLUIDO	COMPOSTO	T _c (°C)	P _c (atm)	ρ (g/cm ³)
Inorgânicos	CO ₂	31	72,85	0,469
	NH ₃	133	111,54	0,236
	H ₂ O	374	217,17	0,323
	N ₂ O	36	71,50	0,452
Hidrocarbonetos	Metano	-82	45,41	0,169
	Etano	32	48,17	0,203
	Propano	97	41,85	0,217
	Pentano	197	33,26	0,237
	Etileno	9	49,65	0,218
	Benzeno	289	49,65	0,218
	Tolueno	319	40,57	0,292
Compostos oxigenados	Metanol	240	79,86	0,272
	Etanol	241	60,61	0,276
	Acetona	235	46,39	0,279
	Éter etílico	194	35,93	0,265
	Metanol	240	79,86	0,272
Compostos nitrogenados	Piridina	347	55,57	0,312

T_c: TEMPERATURA CRÍTICA, P_c: PRESSÃO CRÍTICA

FONTE: HIERRO e SANTA-MARIA (1991).

Apesar de todas as características boas e vantajosas do scCO₂, sua principal desvantagem é a apolaridade, o que torna a utilização desse componente puro não apropriada para extração de compostos polares e matrizes com alto poder de retenção, sendo necessário o emprego de modificadores (cossolventes) para alterar sua polaridade e aumentar o seu poder de solubilização. Os modificadores também podem reduzir a interação composto-matriz melhorando a sua extração quantitativa (LI, 2008; HERRERO et al., 2010). A seleção dos cossolvente é baseada nos parâmetros de solubilidade e na polaridade do componente de interesse e solvente. Geralmente o etanol é o cossolvente mais empregado, pois atende as exigências legais para o uso de solventes orgânicos em insumos para a indústria de

alimentos (MICHIELIN, 2009). O cossolvente deve ser removido do produto final e, mesmo utilizado em poucas quantidades, requer o uso do calor e, conseqüentemente, apresenta as mesmas desvantagens de necessidade pós-processamento e possível degradação de compostos termolábeis das extrações com solventes orgânicos.

Valentová et al. (2003) estudou diferentes métodos de extração para a obtenção de extratos de folhas de yacon e dentre esses métodos a extração supercrítica foi citada, porém não foi explicada a metodologia usada, o solvente supercrítico utilizado e também não foi relatada nenhuma discussão com relação à extração.

Uma patente menciona o estudo as folhas e as raízes do yacon, objetivando fornecer um componente útil extraído do yacon e proporcionar um alimento funcional extraído com dióxido de carbono ($T = 40 - 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 20\text{ Mpa}$). Os extratos das folhas apresentaram potencial antimicrobiano e anticâncer, enquanto os extratos das raízes não apresentaram atividade (ARMANDO et al. 2003).

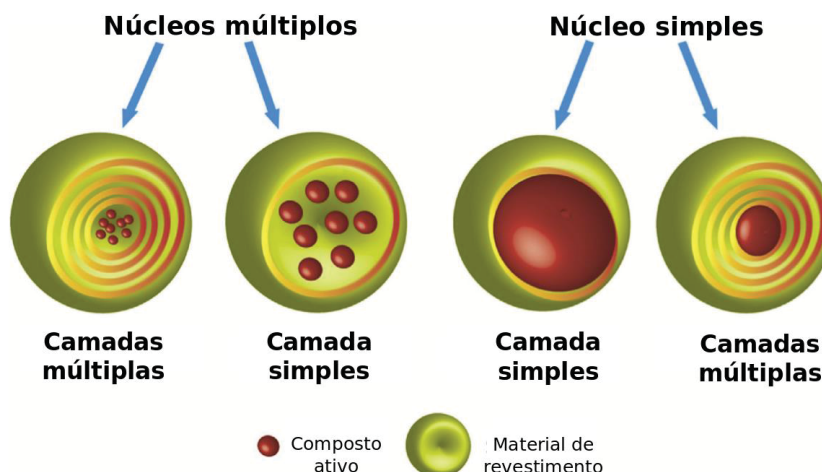
Até o presente momento, na literatura há somente o artigo científico publicado pelo nosso grupo de pesquisa que avaliou o rendimento, atividades antioxidantes e perfil de ácidos graxos de extratos obtidos por extração supercrítica com scCO_2 e scCO_2 + cossolvente. Os dados serão discutidos posteriormente na sessão 4.

2.4 FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS

A encapsulação é definida como um processo em que pequenas partículas ou gotículas são cercadas por um revestimento, ou são incorporados à uma matriz homogênea ou heterogênea para a obtenção de pequenas cápsulas com diversas propriedades e aplicações. O material a ser encapsulado é chamado de núcleo, material ativo ou fase interna, enquanto que o material de revestimento é chamado de material de parede, carreador, membrana, casca ou agente de encapsulação. O núcleo pode ser composto por um ou mais ingredientes e a casca pode ser formada por uma ou mais camadas conforme ilustrado na FIGURA 6 (GHARSALLAOUI et al., 2007; GIBBS et al., 1999).

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) as partículas obtidas no processo de encapsulação podem ser divididas em macro (1 - 100 μm), micro (0,1 - 1 μm) e nanopartículas (1 - 100 nm) (SLOMKOWSKI et al., 2011). Em termos de forma e construção, as partículas podem ser divididas em dois grupos: microcápsulas onde o núcleo é nitidamente concentrado na região central, circundado por um filme definido e contínuo do material de parede, e microesferas onde o núcleo é disperso em uma matriz de maneira uniforme. O primeiro grupo é classificado como sistema do tipo reservatório e caracteriza as “verdadeiras” microcápsulas. O segundo grupo é classificado como sistema matricial e resulta nas denominadas microesferas (KING, 1995; MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003).

FIGURA 6 – TIPOS DE MICROCÁPSULAS



FONTE: Adaptado de KATOUZIAN e JAFARI, 2016.

Os principais agentes de encapsulação são os carboidratos (amido, amidos modificados, dextrinas, sacarose, celulose e quitosana), gomas (goma arábica, alginato e carragena), lipídios (cera, parafina, óleos e gorduras hidrogenadas), proteínas (glúten, caseína, gelatina e albumina) e materiais inorgânicos (sulfato de cálcio e silicatos) (SANTOS et al., 2005; SILVA et al., 2015).

O agente de encapsulação usado nesse trabalho foi o amido de milho modificado (Hi-Cap 100), que é um anidrido succínico de n-octenilo (OSA) derivado do milho ceroso e especialmente adequado para a encapsulação de aromas, vitaminas e especiarias. Esse carboidrato apresenta excelente resistência à oxidação, baixo custo e atua como substituto da goma arábica e da gelatina (MEZZOMO et al., 2012). É amplamente utilizado como geleificante, espessante,

agente estabilizante e preenchimento em alimentos preparados (GALANAKIS; TORNBERG; GEKAS, 2010).

As partículas têm a capacidade de modificar e melhorar a aparência e as propriedades de um composto. O uso da microencapsulação na indústria de alimentos é justificado para atender diversas necessidades, como para reduzir a reatividade do material de núcleo com o ambiente, prolongar a estabilidade do produto, diminuir a velocidade de evaporação ou de transferência do material de núcleo para o meio, facilitar a manipulação do material encapsulado, promover liberação controlada de determinadas substâncias, mascarar sabor e odor desagradáveis, e promover a diluição homogênea do material encapsulado em uma formulação alimentícia (KATOUZIAN; JAFARI, 2016).

A encapsulação pode ser realizada por diversas técnicas e a seleção do método depende da aplicação que será dada à microcápsula, do tamanho desejado, do mecanismo de liberação e das propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante (AZEREDO, 2005; RÉ, 2000). Essas técnicas podem ser classificadas em processo físico como: *spray-drying*, *spray-cooling*, *spray-chilling*, *ar suspension coating*, extrusão, extrusão centrífuga, liofilização e separação de suspensão rotacional; e como processos químicos como coacervação, co-cristalização, aprisionamento de lipossomas, polimerização interfacial, inclusão molecular, etc (DESAI; PARK, 2005).

A aplicação dos fluidos supercríticos como uma alternativa para esses processos de precipitação convencionais tem sido um campo ativo de pesquisa e inovação nas duas últimas décadas (COCERO et al., 2005). A principal motivação para isso é a possibilidade de explorar as propriedades peculiares dos fluidos supercríticos e, em particular, do scCO_2 , o fluido supercrítico mais utilizado para processos de precipitação.

2.4.1 Formação de Partículas usando Fluidos Supercríticos

Os processos de encapsulação supercrítica podem ser classificados de acordo com o papel do fluido supercrítico no processo: solvente, anti-solvente, co-solvente ou soluto (YEO; KIRAN, 2005).

O processo de Expansão Rápida de Soluções Supercríticas (RESS) emprega o fluido supercrítico como solvente. Esse processo baseia-se na exploração de grandes variações no poder solvente de fluidos supercríticos com mudanças na pressão. Um soluto dissolvido em um fluido supercrítico em uma extração em alta pressão precipita quando o fluido supercrítico é expandido e a pressão é reduzida. O processo RESS também pode ser usado para produzir compostos. A implementação mais direta é dissolver a substância ativa e o material de revestimento no fluido supercrítico e co-precipitar ambas as substâncias. Desta forma, a maior limitação desta técnica é a baixa solubilidade de muitas substâncias (compostos ativos) no scCO_2 . O uso de cossolventes foi proposto com o objetivo de minimizar esta limitação, uma vez que resulta no aumento da solubilidade do soluto no fluido supercrítico a fim de melhorar a dispersão das fases, originando assim a técnica de Impregnação por Solvente Supercrítico (SSI) (COCERO et al., 2009).

O método PGSS (partículas de soluções saturadas de gás) utiliza os fluidos pressurizados como soluto. Esse método é utilizado para produzir partículas que absorvem fluidos supercríticos em altas concentrações, e pode resultar na produção de partículas de polímeros puros (encapsulante), assim como na incorporação de um composto ativo nas mesmas. Neste processo, o fluido supercrítico é dissolvido num material sólido fundido e essa mistura é rapidamente despressurizada, resultando na formação de partículas por precipitação. Uma desvantagem desta técnica é que poucas substâncias podem ser fundidas a altas temperaturas sem a ocorrência de degradações químicas ou físicas (COCERO; MARTIN, 2008).

Nos processos que utilizam os fluidos supercríticos como antissolvente, há um contato de uma solução do composto ativo com um solvente líquido e com um fluido supercrítico. Após a mistura, o fluido supercrítico satura o solvente líquido removendo-o da mistura por extração, resultando na precipitação do soluto (composto ativo) através de um efeito antissolvente (COCERO et al., 2009; AGUIAR et al., 2016).

As técnicas que utilizam os fluidos supercríticos como antissolvente são: Gás Antissolvente (*Gas Anti Solvent* - GAS), Antissolvente Supercrítico (*Supercritical Anti Solvent* - SAS), Sistema de Extração de Solvente Aerosol (*Aerosol Solvent Extraction System* - ASES), Precipitação com Antissolvente Comprimido (*Precipitation with Compressed Antisolvent* - PCA), Extração de Emulsões por Fluidos Supercríticos (*Supercritical Fluid Extraction of Emulsions* - SFEE) e

Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (*Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids* - SEDS). A principal diferença entre essas técnicas é a maneira como ocorre o contato entre a solução (composto ativo + solvente líquido) e o antissolvente.

2.4.2 Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE)

O processo de formação de partícula conhecido como SFEE combina técnicas de emulsão convencional com as propriedades únicas dos fluidos supercríticos para produção de micro e nanopartículas (CHATTOPADHYAY; HUFF; SHEKUNOV, 2006).

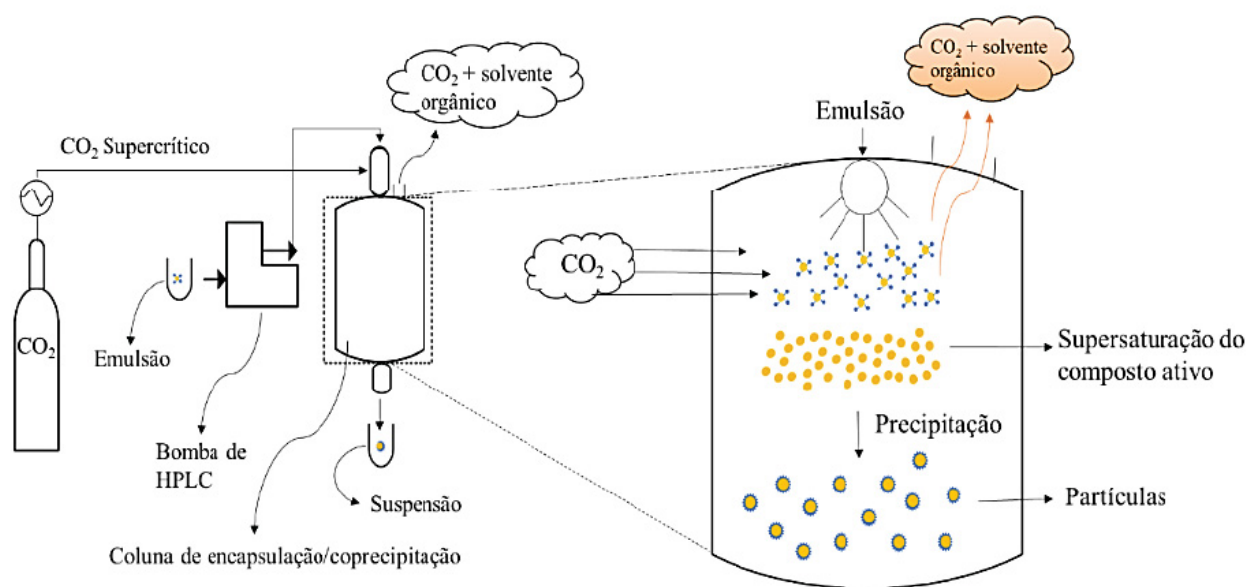
O método SFEE é uma variação do processo SAS, e pode ser chamado de SAS de emulsões. Nesse processo, são preparadas duas soluções: uma fase orgânica que é composta pelo composto ativo (que pode ser um extrato ou uma mistura de compostos ativos) em um solvente líquido convencional e uma fase dispersa ou contínua, que é composta por água e o agente de encapsulação. Na sequência, essas duas soluções são estabilizadas por um emulsificante/surfatante formando uma emulsão. Em seguida, a emulsão é alimentada no sistema de precipitação com o scCO_2 , que extrai o solvente orgânico por afinidade química, levando a uma rápida saturação do composto ativo, e, logo, a uma rápida precipitação. Nesse momento, o emulsificante facilita a interação entre o agente de encapsulação e o composto ativo, ocasião em que ocorre a encapsulação (LIMA REIS et al., 2019). A FIGURA 7 ilustra a encapsulação por SFEE.

O processo SFEE tem sido utilizado para a encapsulação em biopolímero de diversos compostos bioativos como o β -caroteno, licopeno, quercetina, oleoresina de pimenta e óleo essencial de folhas de louro (MATTEA et al., 2009; MEZZOMO et al., 2012; SANTOS et al., 2012; LÉVAL et al., 2015; AGUIAR et al., 2016; LIMA REIS et al., 2019).

Lima Reis et al. (2019) encapsularam óleo essencial de folha de louro em amido de milho modificado pelo SFEE. O solvente utilizado foi o diclorometano e os parâmetros do processo usados foram temperatura (40 °C), pressão (10 Mpa), vazão da emulsão (1 mL/min), vazão de CO_2 (1 kg/h). As partículas obtidas

apresentaram tamanhos de 38 a 90 nm e as suspensões apresentaram eficiência de encapsulação de 48,9 a 75,5 % pela técnica de UV-VIS.

FIGURA 7 – ENCAPSULAÇÃO PELO MÉTODO SFEE



FONTE: LIMA REIS et al. (2019).

Aguiar et al. (2016) encapsularam capsaicinoides em amido de milho modificado usando SFEE. O solvente orgânico utilizado foi o acetato de etila e os parâmetros do processo estudados foram a temperatura (40 °C), pressão (9 a 11 Mpa), vazão da emulsão (0,5 e 1 mL/min), vazão de CO₂ (22,5 g/min). As partículas obtidas apresentaram tamanhos de 126 a 137 nm e as suspensões apresentaram eficiência de encapsulação de 21,53 a 39,98 % pela técnica HPLC.

Santos et al. (2012) estudaram a encapsulação de β -caroteno e licopeno em amido de milho modificado. O solvente orgânico utilizado também foi o diclorometano e os parâmetros estudados foram a temperatura (50 °C), pressão (9 a 13 Mpa), vazão da emulsão (2,5 a 5,5 cm³/min), vazão de CO₂ (10 kg/h). As partículas obtidas apresentaram tamanhos de 344 a 366 nm e as suspensões apresentaram eficiência de encapsulação de 34 a 89 % pela técnica de UV-VIS.

Mezzomo et al. (2012) estudaram a encapsulação de carotenoides pelos processos SAS e SFEE. No SFEE, o solvente orgânico utilizado também foi o diclorometano e os parâmetros estudados foram a temperatura (40 °C), pressão (10 Mpa), vazão da emulsão (4 mL/min), vazão de CO₂ (4 kg/h). As partículas após a

liofoilização apresentaram tamanho de 0,8 a 7 mm e eficiência de encapsulação de 93 % pela técnica HPLC.

Mattea et al. (2009) estudaram a encapsulação de β -caroteno em amido de milho modificado. O solvente orgânico utilizado foi o diclorometano e os parâmetros do processo estudados foram a temperatura (35 a 50 °C), pressão (8 a 13 Mpa), vazão da emulsão (0,3 a 1 kg/h), vazão de CO₂ (2 a 4 kg/h). As partículas obtidas apresentaram tamanho médio abaixo de 400 nm em suspensão em meio aquoso, que também era o tamanho médio das gotículas da emulsão.

2.5 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

A comunidade científica tem feito um esforço considerável para promover o desenvolvimento de técnicas e processos que preservem o meio ambiente e as indústrias alimentícias e farmacêuticas têm se interessado em desenvolver produtos de alta qualidade, que ofereçam segurança ao consumidor e no aproveitamento de resíduos com o intuito de reduzir o impacto ambiental e ao mesmo tempo agregar valor a esses subprodutos.

As folhas de yacon são utilizadas na medicina popular, devido às suas ações terapêuticas reconhecidas. Já as flores não são utilizadas, sendo descartadas durante a colheita das raízes e folhas da planta. A investigação das propriedades das flores é recente, apesar disso, já existem a presença de compostos ativos com efeitos benéficos à saúde humana amplamente avaliados e comprovados. Tais relatos justificam o estudo e desenvolvimento de técnicas que preservem estes extratos e possibilitem as suas aplicações de diferentes formas.

Considerando que grande parte das substâncias ativas apresentam sensibilidade térmica, a precipitação destes em micropartículas poliméricas pode conferir estabilidade e proteção a estes materiais bioativos de interesse, garantindo que mantenham suas propriedades no produto final, após a exposição a condições adversas que possam causar degradação dos mesmos. Assim sendo, o encapsulamento desses materiais é uma alternativa bastante atraente do ponto de vista tecnológico e econômico.

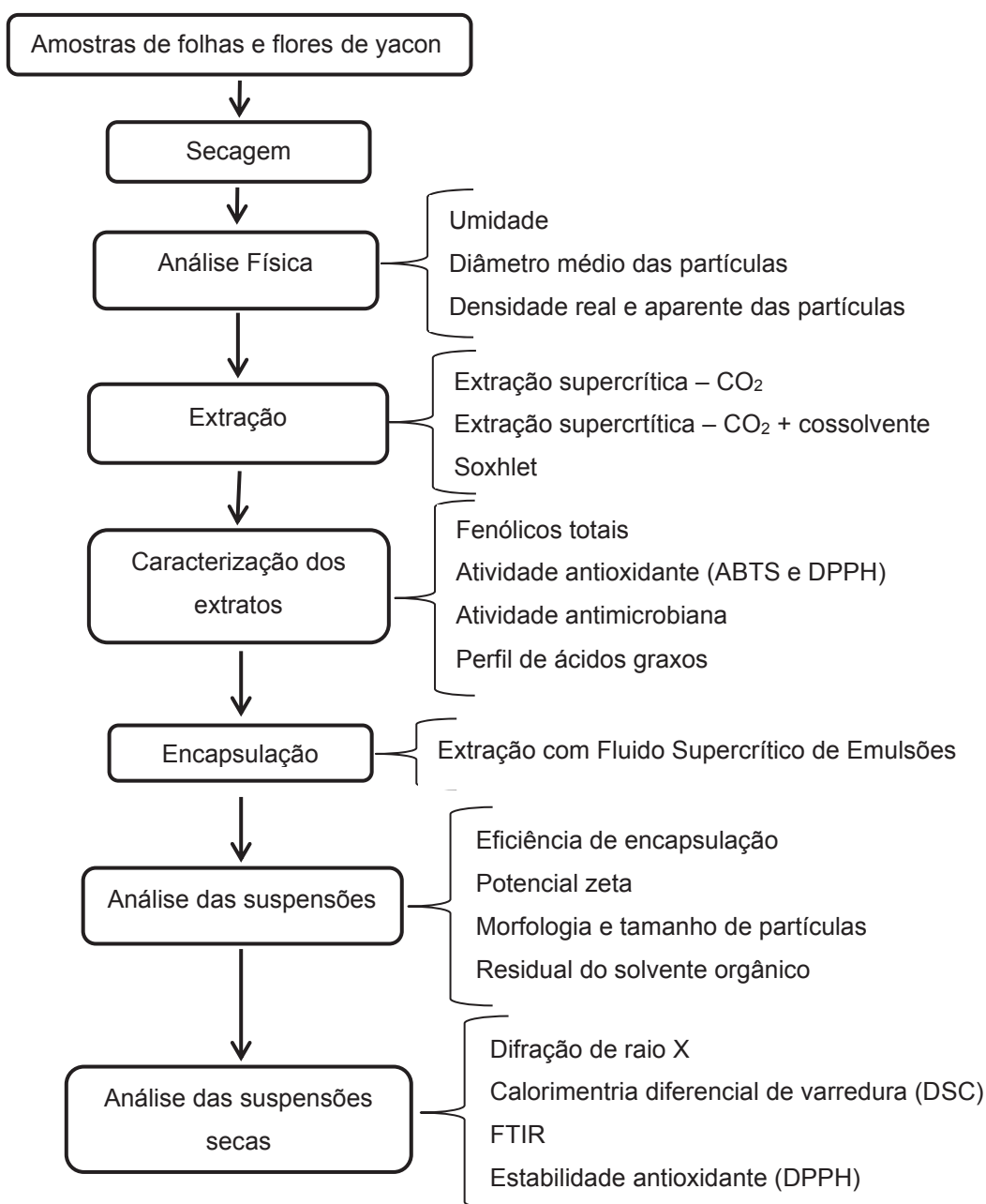
A motivação para a realização do presente estudo se baseou no potencial de aproveitamento que os resíduos da produção de raízes do yacon oferecem, aliado

ao fato de não serem encontrados estudos na literatura envolvendo extração supercrítica de folhas e flores de yacon. Assim como, a falta de dados na literatura, até o presente, sobre a encapsulação desses materiais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo descreve os materiais e os métodos que foram empregados no desenvolvimento do trabalho. Na FIGURA 8 encontra-se ilustrado um resumo dos experimentos e análises realizadas.

FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS E ANÁLISES QUE FORAM REALIZADAS NO DECORRER DO TRABALHO



FONTE: A AUTORA (2019).

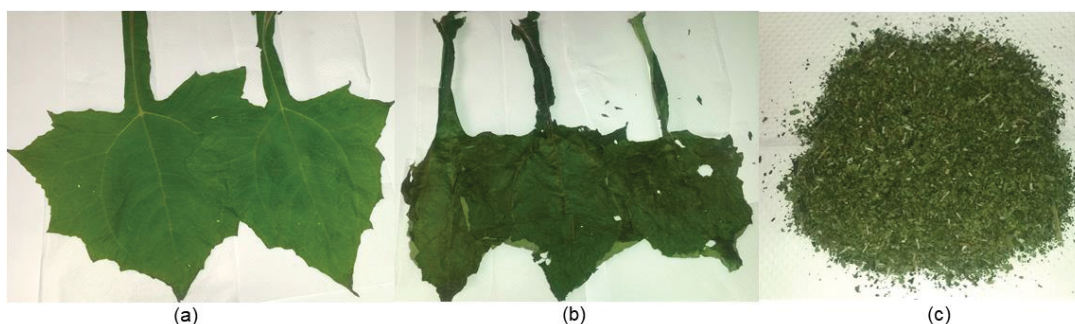
3.1 OBTENÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA

As folhas e flores de yacon utilizadas para as extrações foram coletadas durante os meses de março e maio de 2017, no município de São José dos Pinhais (Colônia Murici), Paraná, Brasil (latitude -25,6256389; longitude -49,1306667; altitude 906 m).

Após a coleta, as folhas de yacon (FIGURA 9) passaram por processo de secagem a temperatura de 40 °C durante 24 horas em estufa com fluxo forçado de ar conforme a metodologia descrita por Valentová e Urichová (2003) e as flores de yacon (FIGURA 10) foram secas na temperatura de 50 °C durante 24h baseada na metodologia descrita por Diniz, Astarita e Santarém (2007) com adaptações.

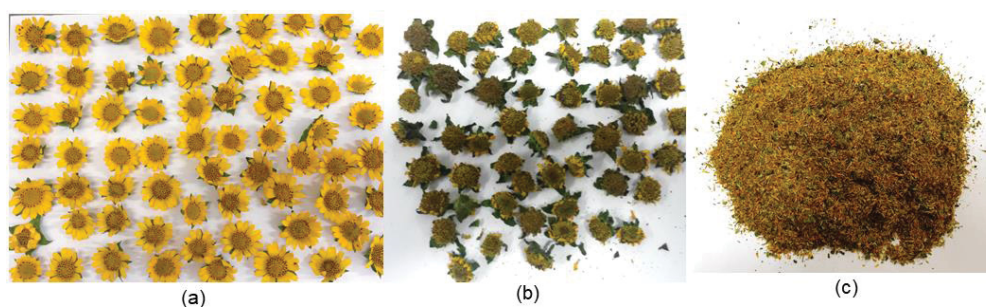
As amostras secas foram moídas em um processador de alimentos doméstico por 10 segundos, acondicionados em sacos de polietileno de baixa densidade e selado sob vácuo e, em seguida armazenado a -18 °C até seu uso.

FIGURA 9 – FOLHAS DE YACON *IN NATURA* (a), SECA (b) E SECA TRITURADA (c)



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 10 - FLORES DE YACON *IN NATURA* (A), SECA (B) E SECA TRITURADA (C)



FONTE: A autora (2019).

3.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS

Os teores de umidade e de substâncias voláteis presentes nas matérias primas foram realizados no laboratório de Tecnologia de Alimentos (LABTECAL) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e determinados pela metodologia 925.09 da AOAC (2005) fundamentada na perda de umidade e substâncias voláteis da amostra submetida a 105 °C. Para o cálculo do teor de umidade e voláteis, foi empregada a EQUAÇÃO 1. O experimento foi realizado em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

$$\% \text{ umidade} = \frac{m_p}{m_i} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: m_p é a perda de massa em gramas e m_i é a massa inicial da amostra em gramas.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULA DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

3.3.1 Determinação do diâmetro médio de partículas

O perfil granulométrico das matrizes foi determinado no Laboratório de Química Analítica Aplicada da Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, da UFPR por ensaio em agitador de peneiras (Produtest, São Paulo, Brasil) durante 15 min com peneiras da série Tyler com diferentes aberturas (meshs 12, 20, 24, 28, 35 e 48) (FIGURA 11). O diâmetro médio de partículas foi calculado de acordo com as EQUAÇÕES (2) e (3), propostas por Gomide (1983).

$$\bar{d}_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \Delta l_i / \bar{d}_i}{\sum_{i=1}^n \Delta l_i / \bar{d}_i^3}} \quad (2)$$

$$\Delta l_i = \frac{m_i}{m_t} \quad (3)$$

Onde \bar{d}_s é o diâmetro médio superficial dos fragmentos (mm), m_i é a massa de amostra retida na peneira i (g), m_t é a massa total de amostra (g), d_i é o diâmetro da peneira i (mm) e n é o número total de frações.

FIGURA 11 – AGITADOR DE PENEIRAS



FONTE: A autora (2019).

3.3.2 Determinação da densidade aparente do leito de partículas (ρ_a)

A densidade aparente do leito de partículas foi determinada através da relação entre a massa de amostra utilizada nas extrações e o volume ocupado no leito de extração supercrítica (EQUAÇÃO 4).

$$\rho_a = \frac{\text{massa da amostra em gramas}}{\text{volume do leito em cm}^3} \quad (4)$$

3.3.3 Determinação da densidade real das partículas (ρ_r)

A densidade real foi determinada utilizando-se a técnica da picnometria em gás hélio pelo Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). A utilização dessa técnica proporciona boa precisão nos resultados, visto que o gás Hélio penetra nos poros da matriz vegetal devido a sua baixa tensão superficial sem alterar suas características, determinando o volume verdadeiro de um sólido, por variação da pressão de gás em uma câmara de volume conhecido.

3.3.4 Porosidade do leito de ESC

A porosidade do leito da ESC foi determinada com cálculo através da EQUAÇÃO (5):

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (5)$$

Onde, ρ_a é a densidade aparente e ρ_r é a densidade real.

3.4 EXTRAÇÃO EM SOXHLET

A extração em Soxhlet de folhas e flores de yacon foi realizada no Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (LACTA), da Universidade Federal do Paraná de acordo com o método 920.39C da AOAC (2005), utilizando os solventes orgânicos acetato de etila, metanol, etanol e etanol-água (1:1, v/v). A água pura foi testada como solvente nas extrações, porém dificuldades experimentais foram encontradas, tais como: inscrustração do extrato no vidro do balão, dificultando a retirada do mesmo e a difícil diluição do extrato, podendo resultar em falsos resultados nas análises posteriores. A TABELA 5 apresenta os valores de polaridade dos solventes que foram empregados.

Polaridade é a diferença de cargas ou diferença de densidade de carga entre os constituintes de uma molécula ou retículo cristalino. Uma molécula apolar é

aquela onde não há diferença de eletronegatividade entre os átomos e, portanto não ocorre deslocamento de carga elétrica ou nuvens eletrônicas na molécula. Já uma molécula polar é aquela onde há diferença de eletronegatividade entre os átomos provocando o deslocamento de carga na molécula.

TABELA 5 – ÍNDICE DE POLARIDADE DOS SOLVENTES UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO EM SOXHLET

SOLVENTE	ÍNDICE POLARIDADE
Acetato de etila	4,4
Etanol	5,2
Metanol	6,6
Etanol-água (1/1, v/v)	7,1

FONTE: BYERS (2008).

O sistema Soxhlet consiste de um extrator que é acoplado na extremidade inferior a um balão e na extremidade superior a um condensador (FIGURA 12). Para cada extração, 5 g das amostras foram envolvidas em um cartucho de papel filtro e inseridas no extrator. O balão foi preenchido com 150 mL de solvente, o que corresponde a uma proporção de amostra-solvente igual à 1:30.

FIGURA 12 – EXTRATOR SOXHLET



FONTE: A autora (2019).

No processo de extração o solvente é aquecido até sua temperatura de ebulição por uma manta. O vapor do solvente sobe até o condensador, resfria e condensa gotejando sobre a matriz vegetal, solubilizando os compostos. Quando a mistura soluto/solvente preenche o sifão, este é esvaziado, retornando ao balão onde é novamente aquecido e o processo de refluxo é repetido até o final de extração. As extrações foram realizadas durante 6 h e os extratos brutos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em freezer doméstico à -18 °C.

As extrações foram realizadas em triplicata e os resultados dos rendimentos expressos como média \pm desvio padrão de acordo com a EQUAÇÃO 6.

$$\text{Extrato (\%)} = \frac{N \times 100}{P} \quad (6)$$

Onde, N é a massa de extrato (g) e P é a massa da amostra (g).

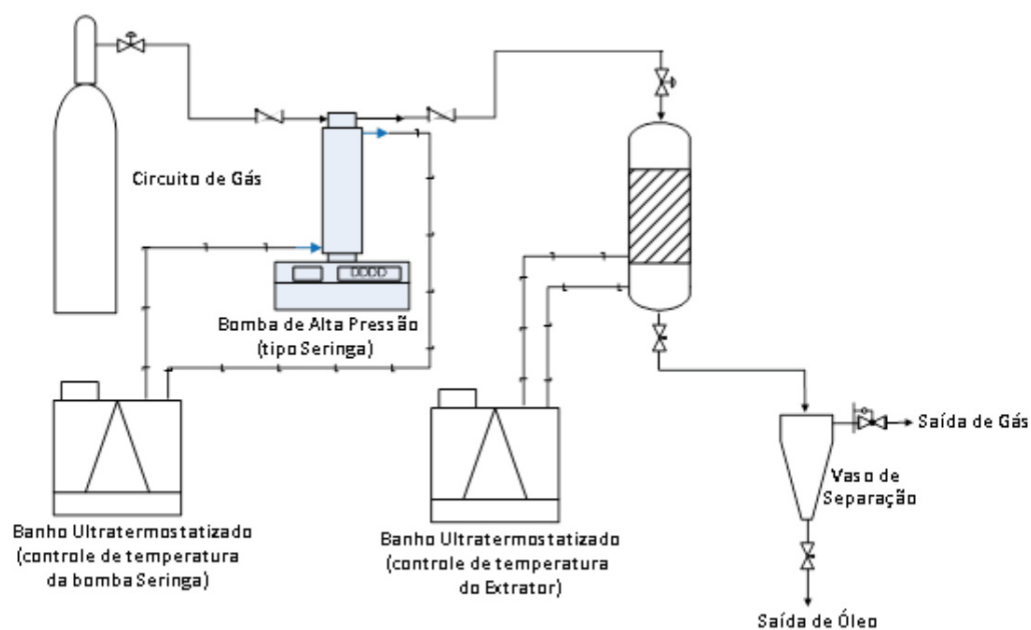
3.5 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

Os experimentos de extração foram realizados na unidade de extração supercrítica do Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (LACTA), da Universidade Federal do Paraná. As condições operacionais utilizadas na ESC foram selecionadas de forma que abrangessem uma ampla faixa de massa específica de solvente, com o objetivo de determinar quais condições de temperatura e pressão proporcionam o maior rendimento global e os melhores parâmetros de qualidade, dentro dos limites de operação do equipamento utilizado.

As extrações utilizando scCO₂ e scCO₂ + cossolvente das folhas e flores de yacon foram realizadas em extratores distintos. As dimensões da unidade que foram realizadas as extrações das folhas são: comprimento (L) = 0,22 m, diâmetro (ϕ) = 1,90 x 10⁻² m e volume interno (V) = 6,24 x 10⁻⁵ m³. As dimensões da unidade usada para as extrações das flores são: L = 0,16 m, ϕ = 2,52 x 10⁻² m e V = 8 x 10⁻⁵ m³. Ambos os extratores com controle de temperatura e pressão. O sistema de extração consiste em um extrator encamisado acoplado a um banho ultratermostatizado, uma válvula agulha para controle de fluxo na saída do extrator, uma bomba tipo seringa

de alta pressão (Teledyne ISCO 500D), sensores de pressão e temperatura. Nas FIGURAS 13 e 14 são apresentados um diagrama esquemático da unidade de extração para fluidos pressurizados e o equipamento de extração supercrítica, respectivamente.

FIGURA 13 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA UNIDADE DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA



FONTE: MESOMO (2015).

FIGURA 14 – EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA



FONTE: A autora (2019).

As extrações supercríticas foram realizadas utilizando CO₂ (White Martins SA, 99,5% de pureza na fase líquida) como solvente e etanol, bem como etanol hidratado (mistura etanol-água) (1/1, v/v), como cossolventes, que foram os solventes líquidos mais eficientes avaliados em testes anteriores.

Um teste preliminar (Ensaio 0) foi realizado usando scCO₂ puro a 50 °C e 20 MPa no entanto, um baixo rendimento foi observado. Portanto, os cossolventes foram utilizados associadas ao scCO₂, visando melhorar o rendimento da extração. Dessa forma, um planejamento fatorial 2³ + 3 pontos centrais (corridas 1-11) foi utilizado (TABELA 6), a fim de avaliar a influência da temperatura (30, 50 e 70 °C), pressão (15, 20 e 25 MPa) e razão etanol / massa (matéria-prima) (RM) (1:1, 2:1, 3:1) nos rendimentos de extração, atividades antioxidantes, perfil dos ácidos graxos e atividade antimicrobiana. Posteriormente, experimentos adicionais a 30 e 70 °C, 25 MPa e RM 3:1 foram realizadas alterando etanol para etanol-água para ver a influência desse cossolvente na extração.

TABELA 6 – MATRIZ DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2³ + 3 PONTOS CENTRAIS USADO PARA EXTRAÇÃO USANDO scCO₂ + ETANOL

Ensaio	T (°C)	P (MPa)	RM (me:ma)
1	30	15	1:1
2	70	15	1:1
3	30	25	1:1
4	70	25	1:1
5	30	15	3:1
6	70	15	3:1
7	30	25	3:1
8	70	25	3:1
9	50	20	2:1
10	50	20	2:1
11	50	20	2:1

T: TEMPERATURA, P: PRESSÃO

FONTE: A autora (2019)

A quantidade de cossolvente foi adicionada e misturada à matéria-prima (massa de cossolvente para massa de sólidos em gramas) e, depois disso, a matéria-prima umedecida foi colocada no extrator antes das extrações. Portanto, o procedimento experimental utilizado foi: cerca de 10 g de folhas ou 15 g de flores foram umedecidos com mistura de etanol ou etanol-água e colocada no extrator, o extrator foi preenchido com scCO₂ na temperatura e pressão desejadas e o tempo de extração estático foi iniciado (um período de confinamento). No final do período

estático (fixado em 60 minutos), a extração dinâmica foi iniciada usando um fluxo de CO₂ comprimido em torno de $2,0 \pm 0,2$ mL/min (controlado e medido pela bomba seringa em 10 °C e na pressão do leito de extração), onde tanto a pressão e a temperatura era controlada todo o tempo.

As curvas de extração das folhas e flores de yacon foram avaliadas coletando e pesando as amostras dos extratos em frasco âmbar em intervalos de 5 minutos. As amostras coletadas foram secas em uma estufa de circulação de ar (40 °C) para remover o cossolvente. A massa de extrato seco foi quantificada gravimetricamente para cada amostragem, armazenada a -18 °C e protegida da luz antes das análises.

3.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

A determinação do teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos foi avaliada segundo o método de Folin-Ciocalteau (ROSSI; SINGLETON, 1965; PESCHEL et al., 2006).

A mistura reacional foi composta por 0,1 mL de soluções de extrato (concentração de 1667 mg/L), 7,9 mL de água destilada, 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteau e 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio a 20 % (m/v). Os frascos foram agitados, deixados em repouso ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 2 hs e depois a absorbância foi medida a 765 nm em espectrofotômetro. O ácido gálico foi usado como padrão para traçar a curva de calibração (faixa de concentração de 0 a 500 mg/mL, $R^2 = 0,99$).

Os valores de absorbância encontrados para cada tipo de extrato foram correlacionados com a curva padrão, e o teor de compostos fenólicos totais (TFT) foi determinado através da EQUAÇÃO 7. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em mg de EAG/g de extrato, como média \pm desvio padrão.

$$TFT \left(mg \frac{EAG}{g_{EXT}} \right) = \frac{(EAG \cdot 1000)}{D_{EXT}} \quad (7)$$

Onde, EAG é equivalente em ácido gálico, obtido através da curva padrão (mg EAG/L) e D é a diluição da amostra (mg extrato/L).

3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As análises antioxidantes foram realizadas no laboratório de Tecnologia de Alimentos (LABTECAL) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.7.1 Método DPPH

A atividade antioxidante pelo método de DPPH foi determinada segundo metodologia descrita por Mensor et al. (2001). Essa técnica se baseia na reação do composto em análise em uma solução etanólica de DPPH na concentração de 0,3 mM e com concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125, 250 e 500 mg/mL) dos extratos analisados (folhas e flores de yacon), por 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido o tempo de reação, faz-se a leitura em espectrofotômetro na absorvância de 517 nm. Quanto maior a atividade antioxidante da amostra testada, mais estável o radical DPPH se torna, provocando a descoloração da solução (DPPH e extrato) e diminuindo sua absorvância (MENSOR et al, 2001). Assim, o percentual de inibição das amostras testadas sobre o radical pode ser calculado convertendo-se a absorvância em percentual de atividade antioxidante (AA %), segundo a equação 8:

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \cdot 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (8)$$

Os valores obtidos para % AA foram plotados em um gráfico de % AA versus concentração e o ajuste dos pontos foi feito por regressão. A partir da regressão, obteve-se um valor conhecido como EC₅₀, que representa a concentração do extrato na qual se obtém uma inibição de 50 % da oxidação. Desse modo, quanto menor o valor de EC₅₀, menor a concentração de extrato necessária para se ter uma maior atividade e, conseqüentemente, maior a atividade antioxidante do extrato (MENSOR et al., 2001). Os resultados encontrados de concentração efetiva (EC₅₀) e atividade antioxidante (% AA) para os extratos analisados foram expressos como média ± desvio padrão.

3.7.2 Método ABTS

A atividade antioxidante dos extratos pelo método de ABTS foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Re et al. (1999), utilizando Trolox, vitamina E sintética (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, EUA) como antioxidante de referência. O radical ABTS foi dissolvido em água destilada até a concentração de 7,0 mM, e submetido à reação com 2,45 mM de persulfato de potássio para a formação do radical em solução de proporção 1:1. A solução foi armazenada no escuro em refrigerador doméstico por 16 horas antes do uso. A solução do radical ABTS⁺ foi diluída em etanol até uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm. Foram preparadas diferentes diluições dos extratos e alíquotas de 30 µL de cada diluição foram transferidas para tubos de ensaios, adicionado 3 mL do radical ABTS na amostra e deixados ao abrigo da luz durante 6 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro na absorbância de 734 nm. Em seguida, foi determinado a equação da reta absorbância versus diluição. Para calcular a atividade antioxidante, foi substituída na equação da reta a absorbância equivalente a 1000 µM do padrão trolox. O valor obtido para o termo x corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000 µM de trolox (EQUAÇÃO 9).

$$y = -ax + b \quad (9)$$

Onde, y é absorbância correspondente a 1000 µM de trolox e x é a diluição (mg/L) equivalente a 1000 µM de trolox.

A partir do resultado encontrado (x) na equação 9, foi dividido por 1000 para ter o valor em g (EQUAÇÃO 10). O resultado final foi calculado pela divisão de 1000 (µM) pelo valor de X(g) e multiplicado por 1(g) para encontrar o valor final (Z) que é expresso em µmol trolox/ g de fruta (porção comestível) (EQUAÇÃO 11).

$$X(g) = \frac{x}{1000} \quad (10)$$

$$y = \frac{1000}{X(g).1} \quad (11)$$

3.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de disco difusão de acordo com a metodologia do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Esta análise foi realizada somente com os extratos das flores de yacon, uma vez que não tinha quantidade suficiente de extratos das folhas para analisá-los.

As cepas de bactéria utilizadas para as análises foram: *Clostridium perfringes* (ATCC® 13124™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Listeria Monocytogenes* (ATCC® 7644™), *Salmonella sp.* (ATCC® 13076™) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™). As bactérias foram reativadas em caldo Mueller Hinton (Kasvi©) e plaqueadas em ágar Mueller Hinton (Kasvi©). Posteriormente foram transferidas para solução salina (0,85%) até atingir concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹, equivalente à turvação da solução padrão de McFarland (bioMérieux©) de 0,5 (80 % de transmitância). As amostras diluídas (0,1 g extrato e 0,7 mL DMSO) foram incorporadas (20 µL) aos discos brancos estéreis (Laborclin©) e depositadas sobre o ágar Mueller Hinton (25 mL) solidificado e inoculado com os microrganismos (10^8 UFC.mL⁻¹). Como controle positivo foram utilizados discos incorporados de Chloramphenicol 30 µg (Laborclin©) e como controle negativo foram utilizados o DMSO (diluyente das amostras). As placas foram incubadas invertidas a 37°C por 24h. A determinação da inibição do crescimento microbiano foi feita por meio da medida dos halos inibitórios, em milímetros, com paquímetro digital.

3.9 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

A composição de ácidos graxos foi realizada somente para os extratos das folhas de yacon e a análise ocorreu no Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos (LACAUT) da UFPR pela preparação de ésteres metílicos de acordo com o método descrito por O'Fallon et al (2007) com modificações. Foram utilizados 0,1 mL de extrato, aos quais foram adicionados, 0,7 mL de solução de KOH 10 M e 5,3 mL de metanol. Após agitação em vórtex, os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 55 °C durante 90 minutos. Posteriormente, 0,58 mL de solução de

ácido sulfúrico 12 M foram adicionados e os tubos foram novamente agitados e incubados em banho-maria a 55 °C durante 90 minutos. Finalmente, 3 mL de hexano foram adicionados e a mistura foi centrifugada para remover o sobrenadante.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados por cromatografia gasosa (CG) (AOCS, método oficial Ce 2-66 (AOAC, 1998)), usando um cromatógrafo a gás Varian (Santa Clara, CA 95051, EUA) (modelo CP 3900) com detector de ionização de chama e equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (CP-SIL 88 CB; 100m x 0,25 mm x 0,2 µm). As condições operacionais do CG-FID foram: Split = 1:100, fluxo de coluna = 2 mL/min, temperatura do detector = 300 °C, temperatura do injetor = 260 °C, forno = 140 – 240 °C (40 min; 2 °C/ min), gás carreador = nitrogênio. As amostras de ésteres metílicos de ácidos graxos foram diluídas em n-hexano (grau cromatográfico) e injetado no CG-FID. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção da mistura padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco, MIX FAME 37, St. Louis, MO 63103 EUA). Cada ácido graxo foi quantificado como porcentagem do total de áreas normalizadas de pico de éster de metila.

3.10 FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Tecnologia Supercrítica e Termodinâmica (LATESC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Na primeira parte do trabalho foram usadas duas matrizes (folhas e flores de yacon) para as extrações, porém para a segunda parte do estudo foi usada somente uma matriz (folha de yacon), devido a disponibilidade de matéria-prima. Dentre os extratos obtidos da folhas, o extrato obtido por Soxhlet com etanol foi selecionado para a realização dos experimentos de formação de partícula pelo método Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE) por apresentar a melhor atividade antioxidante e maior quantidade de ácido γ-linolênico.

3.10.1 Formação das emulsões

Para o SFEE, sete emulsões foram realizadas (50 mL cada), todas com uma formulação padrão e com base nos dados da literatura publicados por Aguiar et al. (2016) e Lima Reis et al. (2019). Os ingredientes foram: concentração de amido de milho modificado (Hi-Cap 100) (30 mg/mL), razão solvente e água (15/85 v/v), concentração de extratos de folhas de yacon (12 mg/mL) e concentração de Tween 80. Além dessas, foi formada também uma emulsão sem extrato de folha de yacon para estudo de comparação da estabilidade da suspensão.

As emulsões foram obtidas por meio de um processo de três etapas: (1) Dispersão do amido em água destilada (agitação magnética por 15 min) + dispersão do extrato de folhas de yacon em acetato de etila (agitação magnética por 15 min), em seguida, (2) a junção dessas dispersões e o acréscimo do Tween 80 para formar a emulsão bruta (agitação magnética por 15 min) e, finalmente, (3) o sistema foi emulsionado durante 10 min na potência de 500 W, frequência de 20 kHz e amplitude de 70 % por sonda ultrassônica (Ultronique, modelo QR500) com camisa resfriada para minimizar o calor gerado pelo equipamento.

Após a preparação, o tamanho hidrodinâmico das gotas das emulsões (D_g) foi imediatamente medido conforme metodologia a seguir e após estabilização (10 min), elas foram usadas nos experimentos SFEE (AGUIAR et al., 2016).

3.10.2 Determinação do diâmetro hidrodinâmico (D_g) das gotículas das emulsões e do índice de polidispersividade (Pdl)

A estabilidade das emulsões foi avaliada pelo D_g e pelo Pdl, pela técnica de espalhamento dinâmico de Luz (DLS), no equipamento Zetasizer Nano S (Malvern Instruments Ltda) no Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN) da UFSC. A distribuição do tamanho de partícula foi realizada para a emulsão inicial. Este procedimento analítico foi realizado em triplicata e os resultados expressos em média e desvio padrão (D_p). Com a estabilidade das emulsões alcançada, realizou-se o processo SFEE.

3.10.3 Extração com Fluido Supercrítico de Emulsões (SFEE)

A Encapsulação Supercrítica foi realizada em um equipamento de extração a alta pressão do Laboratório de Tecnologia Supercrítica e Termodinâmica (LATESC/UFSC) adaptado de acordo com trabalhos descritos por Mezzomo et al. (2012).

Para estudos sobre a influência dos parâmetros de processo, um desenho experimental $2^2 + 3$ pontos centrais foi realizado com a pressão (P) e vazão da emulsão (Q_E) (TABELA 7).

Os níveis das variáveis foram definidos de acordo com um estudo de equilíbrio de fases a alta pressão para uma mistura binária entre o acetato de etila e o CO_2 . A mistura de acetato de etila e CO_2 a 38 °C com fração molar de 0,9 tem como pressão crítica 8,5 MPa (DELLA PORTA; VOLPE; REVERCHON, 2006, SMITH et al., 1998), ou seja, condições de operações acima de 38 °C e 8,5 MPa mantêm o sistema em fase supercrítica. Nessas condições, a água é apenas ligeiramente solúvel no scCO_2 (KING et al., 1992) enquanto o acetato de etila é completamente solúvel. Com base nesses dados, a T do processo foi fixada em 40 °C, a P variou de 9 a 13 Mpa e Q_E variou de 0,5 a 1,5. A vazão de CO_2 foi mantida constante ($Q_{\text{CO}_2} = 1 \text{ kg/h}$).

TABELA 7 - MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL $2^2 + 3$ PONTOS CENTRAIS

Experimentos	P (Mpa)	Q_E (mL/min)
1	9 (-1)	0,5 (-1)
2	13 (+1)	0,5 (-1)
3	9 (-1)	1,5 (+1)
4	13 (+1)	1,5 (+1)
5	11 (0)	1,0 (0)
6	11 (0)	1,0 (0)
7	11 (0)	1,0 (0)

P: PRESSÃO, Q_E : VAZÃO DA EMULSÃO

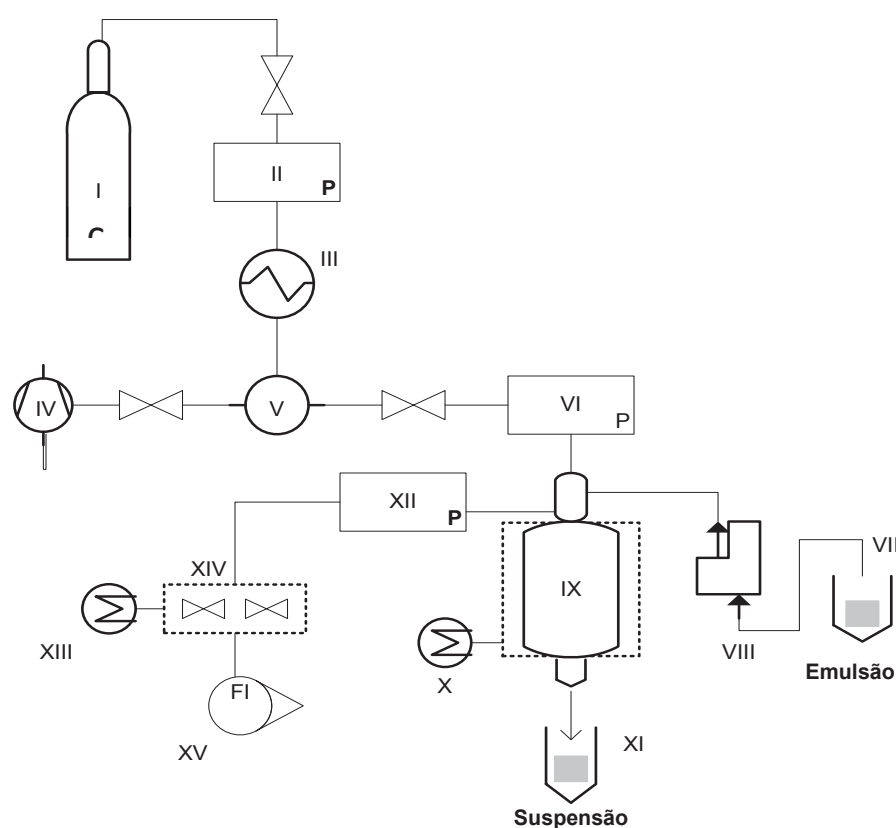
FONTE: A autora (2019)

A unidade SFEE é apresentada por um diagrama esquemático e pelo equipamento SFEE apresentados nas FIGURAS 15 e 16, respectivamente.

Esse equipamento possui os constituintes: reservatório de CO_2 (I); que alimenta o CO_2 através de uma linha com controle de pressão (II), imerso em banho termostático (III) programado para manter a temperatura abaixo de 5 °C. O fluido

entra na bomba hidropneumática (V), (M111 Maximator, Niedersachsen, Alemanha), fornecida por ar comprimido (IV) a pressões (P_{ar}) de 1 a 5 bar, de acordo com a operação do sistema (P_{system}) e seguindo a relação 1:130 para $P_{ar}:P_{system}$. O fluxo de CO_2 supercrítico foi monitorado por um segundo manômetro (V1), (WIKA do Brasil, PI: Cat 233.50.10), conectado à coluna de coprecipitação/ encapsulação (IX) por um tubo concêntrico. A coluna é composta por um cilindro de aço inoxidável (62 cm de comprimento, 2,40 cm de diâmetro, 289,50 mL de volume), ligado a um banho de aquecimento termostático (X) e ajustado à temperatura de funcionamento desejada. As válvulas V1 e V2 (XIV) são responsáveis pelo controle do fluxo de CO_2 , que é medido por um rotâmetro (XV). O $scCO_2$ foi injetado na coluna de coprecipitação/encapsulação para atingir a pressão de processo definida na temperatura definida.

FIGURA 15 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO EQUIPAMENTO SFEE



I – CILINDRO DE CO_2 , II - MANÔMETRO DE CILINDRO DE CO_2 , III - BANHO TERMOSTÁTICO PARA RESFRIAMENTO DO CO_2 , IV – COMPRESSOR DE AR, V – BOMBA HIDROPNEUMÁTICA, VI - MANÔMETRO, VII – RECIPIENTE COM A EMULSÃO, VIII – BOMBA DE HPLC, IX – COLUNA DE ENCAPULAÇÃO,, X – BANHO TERMOSTÁTICO PARA AQUECIMENTO DO EXTRATOR, XI – COLETOR DE SUSPENSÃO, XII – TOMADA DE MANÔMETRO, XIII – HEATED BATH, XIV – MICRO E MACRO VÁLVULAS, XV – ROTÂMETRO.

FONTE: Adaptado de LIMA REIS et al., 2019.

Uma bomba de cromatografia líquida (HPLC, Constametric 3200 P/F, EUA) (VIII), injeta a emulsão na coluna de encapsulação (IX), através de um tubo concêntrico (VII) na forma spray com fluxo controlado. Os fluxos de CO₂ e emulsão foram continuamente bombeados dentro da coluna a temperatura e pressão pré-estabelecidas.

FIGURA 16 – EQUIPAMENTO SFEE



FONTE: A autora (2019).

Depois da emulsão ser alimentada na coluna, o sistema foi seco com scCO₂ durante 1,5 hs para assegurar a remoção completa do acetato de etila. A mistura de CO₂/acetato de etila foi despressurizada e descartada continuamente para ventilação, enquanto a suspensão das partículas foi coletada no fundo da coluna em frascos de vidro âmbar e armazenada em geladeira (Flex, Brastemp, Brasil) a 4 °C até secagem e análise.

Uma fração das suspensões formadas por SFEE foi reservada para as análises de eficiência de encapsulação (EE), potencial zeta (PZ), morfologia e tamanho de partícula, teor residual de acetato de etila e estabilidade antioxidante.

Outra fração das suspensões foi colocada em uma placa de petri de vidro e congelada a -50 °C durante 24 hs. Em seguida, essa fração foi seca em liofilizador (marca Liotop, Modelo L101), por aproximadamente por 36 horas. A amostra seca foi utilizada para as análises de difração de raio x em pó (PDRX), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), perfil calorimétrico (DSC) e estabilidade antioxidante das partículas encapsuladas.

3.10.4 Eficiência de encapsulação (EE) do processo SFEE

A EE das suspensões foi determinado de acordo com o método descrito por Lima Reis et al., (2019). As suspensões foram diluídos em dimetil sulfóxido PA (20 mg/mL) e homogenizadas em limpador ultrassônico (Ultronique, Q3.0/ 37 A) por 10 min. Em seguida, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis (Perkin Elmer Lambda 10) a 416 nm. O Dimetil sulfóxido (DMSO) foi utilizado como branco e o cálculo da massa encapsulada realizada por meio da correlação entre a curva analítica do extrato de folha de yacon em DMSO com diferentes concentrações, de acordo com a EQUAÇÃO 12:

$$C_e = \frac{(\lambda - 0,0969)}{0,0881} \quad R^2 = 0,99 \quad (12)$$

C_e = concentração do extrato na emulsão

λ = absorbância da amostra

A eficiência de encapsulação (EQUAÇÃO 13):

$$EE = \frac{C_p}{C_e} \times 100 \% \quad (13)$$

Sendo, EE = eficiência de encapsulação; C_p = concentração de extrato nas partículas; C_e = concentração de extrato na emulsão.

3.10.5 Potencial Zeta (PZ) das suspensões

O PZ das suspensões foi determinada pela técnica de Anemometria Doppler associada á microeletroforese utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), no LINDEN da UFSC. As leituras foram realizadas a 25 °C a partir de uma alíquota das suspensões diluídas em água destilada (1:2/v:v) de acordo com o limite de leitura da turbidez do equipamento no pH das amostras (pH ~ 4,2).

3.10.6 Morfologia e tamanho médio das partículas

As micrografias das suspensões foram realizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em equipamento marca JEOL (JEM-1011), com tensão máxima de aceleração de 100 kV e ampliação de até 60.000 vezes, localizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. As amostras foram diluídas para um teor de sólidos de 60% e gotejadas sobre uma malha de cobre de 300 mesh/m² coberta com carbono. As grades com as amostras foram secas à temperatura ambiente por 72 horas e analisadas sob tensão de 80 kV.

O tamanho médio de partícula (Dp) foi determinado usando o Software Size Meter (versão 1.1) e expresso junto com o desvio padrão (MACHADO JR et al., 2014).

3.10.7 Teor residual de acetato de etila das partículas

A concentração remanescente de solvente orgânico nas suspensões foi medida por cromatografia gasosa por headspace na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. Para realizar a análise, 100 µL de amostra foram introduzidos em um frasco e este frasco foi hermeticamente fechado com um septo. O frasco foi aquecido por 300 s em velocidade de agitação (250 rpm) a 80 °C e, após esse período, uma amostra do vapor da parte superior do frasco foi retirada com uma seringa e introduzida no

cromatógrafo. O aparelho usado para essa análise foi um cromatógrafo a gás Agilent Technologies 19091S-433HP-5MS acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS), com uma coluna de 30 m x 250 μ m x 0,25 μ m. As condições de operação foram: temperatura do injetor = 220 °C, temperatura da coluna = 325 °C, vazão do injetor = 24 mL/min e razão de separação (diluição da amostra) 50:1. Os resultados foram expressos como ppm de acetato de etila na suspensão.

3.10.8 Difração de raios - X (PDRX) das partículas

O amido modificado puro e as partículas produzidas pelo ensaio 3 (ensaio que proporcionou a maior eficiência de encapsulação) foram selecionados para a análise de PDRX na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. Os dados PDRX foram coletados do difrattômetro Phaser D 2 (Bruker) θ - θ equipado com uma fonte de Cu Ka source (λ = 1.5418 Å), operado a 30 kV e 10 mA, usando um detector de cintilação bidimensional contra LYNXEYE. Os dados de difração de partículas foram coletados em ângulo de 2θ , variando entre 5 e 50 ° com tempo de etapa de 0,5 s.

3.10.9 Caracterização por calorimetria diferencial de varredura (DSC) das partículas

O perfil calorimétrico das partículas, extrato de folhas de yacon e amido modificado puro foi determinado na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC em um aparelho de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) (Perkin-Elmer, modelo 400). As amostras foram preparadas em placas de alumínio (peso amostra = 6 mg) e medidas de DSC foram realizadas por aquecimento de -10 a 400 °C a uma taxa de 20 °C/min, seguido por um resfriamento de 400 a 10 °C, a 20 °C/min. As análises foram realizadas em atmosfera inerte (fluxo de N₂ = 50 mL/min) e temperatura de fusão (t_m) foi obtida no segundo aquecimento, a partir dos picos endotérmicos registrados.

3.10.10 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das partículas

As medições de FTIR das partículas, extrato de folhas de yacon e amido modificado puro foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC em um espectrômetro Agilent Technologies – Cary 600 Series FTIR. Aproximadamente 1 mg de cada amostra foi triturado com KBr e prensado em um pellet para caracterização de FTIR dentro da faixa de número de onda no intervalo de 400-4000 cm^{-1} .

3.10.11 Estabilidade antioxidante das amostras encapsuladas

O extrato de folhas de yacon e as partículas produzidas pelo ensaio 3 (suspensão e amostra seca) foram selecionadas para essa análise. As amostras foram expostas à duas condições por meio de monitoramento da degradação antioxidante por medidas periódicas de absorbância durante 18 dias de exposição, utilizando um espectrofotômetro UV-Visível (Nova 1600). Na primeira condição, a suspensão e o extrato foram mantidos à temperatura ambiente sob atmosfera natural e exposição à luz. Já na segunda condição, a partícula seca e o extrato foram armazenados em estufa a 60 °C. A cada seis dias, a atividade antioxidante (AA) foi determinada pelo método DPPH de acordo com Mensor et al. (2001) e detalhado pelo nosso grupo de pesquisa (CRUZ et al., 2019).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de rendimento global, teor de compostos fenólicos totais, atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos, eficiência de encapsulação, teor residual de acetato de etila e estabilidade antioxidante das partículas foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) a um nível de 95 % de confiança utilizando o software Statistica para Windows 7,0 (StatsoftInc., EUA). Além

disso, as respostas analisadas no planejamento experimental foram realizadas utilizando o mesmo Software, utilizando a metodologia de superfície de resposta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados dos extratos provenientes das folhas e flores de yacon e a formação de partículas usando fluido supercrítico para a encapsulação do extrato de folhas de yacon obtido por Soxhlet com etanol.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS FORMADO PARA A ESC

Com o intuito de caracterizar as matérias-primas utilizadas no presente trabalho, e também o leito formado para a ESC, foram realizadas análises preliminares. Essas caracterizações são de suma importância para o entendimento dos mecanismos de transferência de massa envolvidos nos processos de extração supercrítica, quando estes são avaliados por modelos matemáticos.

O conteúdo de umidade das folhas e flores de yacon frescas foi de 76,94 e 81,71 %, respectivamente. As folhas e flores secas e moídas apresentaram umidade de 8,43 e 5,96 %, tamanho de partícula de 0,2 mm, densidade aparente de 160 e 203 kg/m³, densidade real de 1440 e 1450 kg/m³ e porosidade do leito de 0,89 e 0,86, respectivamente.

4.2 RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES (X_0)

O X_0 é definido como a quantidade de extrato presente na matriz sólida possível de ser extraído pelo solvente nas condições pré-estabelecidas, e indica quantitativamente a eficiência do processo. A TABELA 8 mostra os resultados dos rendimentos, índice de polaridade de cada solvente usado e as densidades do scCO₂ nas diferentes combinações de temperatura e pressão aplicadas. O rendimento do Soxhlet com etanol foi considerado como referência para calcular a porcentagem de extração (%) de todas as extrações.

TABELA 8 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RENDIMENTOS OBTIDOS NAS EXTRAÇÕES DE FOLHAS E FLORES DE YACON

Ensaio	Método de Extração	T (°C)	P (MPa)	RM (m _e :m _a) ¹	Densidade CO ₂ (kg/m ³)	Tempo de Extração (min)		Rendimento de extração ² (%)		Porcentagem de extração ³ (%)	
						Folha	Flor	Folha	Flor	Folha	Flor
0	ESC – CO ₂	50	20	-	784	60	100	0,27	1,72	3,70	12,07
1		30	15	1:1	847	30	35	2,33	3,92	31,96	27,53
2		70	15	1:1	506	30	40	3,82	4,49	52,40	31,53
3		30	25	1:1	922	65	85	2,32	2,94	31,82	20,64
4		70	25	1:1	737	30	80	3,76	4,09	51,58	28,72
5	ESC – CO ₂ + etanol	30	15	3:1	847	55	75	4,32	5,37	59,26	37,71
6		70	15	3:1	506	30	40	5,14	9,11	70,51	63,97
7		30	25	3:1	922	60	90	3,52	4,15	48,29	29,14
8		70	25	3:1	737	35	55	5,22	10,58	71,60	74,30
9		50	20	2:1	784	35	45	3,76	6,53	51,58	45,86
10		50	20	2:1	784	35	50	3,73	6,61	51,17	46,41
11		50	20	2:1	784	30	40	3,70	6,68	50,75	46,91
12	ESC – CO ₂ +	30	25	3:1	922	65	80	3,83	11,11	52,54	78,01
13	etanol-água	70	25	3:1	737	55	60	5,11	19,43	70,09	136,45
Baixa pressão											
				Índice de Polaridade							
14	Soxhlet	Etanol-água		7,1		360	360	19,39 ± 0,34	31,12 ± 1,69	265,98	218,54
15		Metanol		6,6		360	360	12,61 ± 0,74	33,26 ± 0,50	172,98	233,57
16		Etanol		5,2		360	360	7,29 ± 0,06	14,24 ± 1,24	100	100
17		Acetato de etila		4,3		360	360	7,05 ± 0,27	4,79 ± 0,13	96,70	33,64

¹RAZÃO MÁSSICA DE ETANOL PARA MATÉRIA PRIMA (SÓLIDOS) (m/m).²MASSA DE EXTRATO DIVIDIDO PELA MASSA DE MATERIAL SECO NO LEITO × 100.³MASSA DE EXTRATO OBTIDO NO FINAL DA EXTRAÇÃO DIVIDIDO PELA MASSA EXTRAÍDA COM SOXHLET ETANOL × 100.

FONTE: A autora (2019).

Na extração por Soxhlet, o melhor rendimento para as folhas de yacon foi encontrado quando etanol-água (19,39 %) foi usado como solvente seguido por metanol (12,61 %) e etanol (7,29 %). Para as flores de yacon, o melhor rendimento foi encontrado com metanol (33,26 %) seguido por etanol-água (31,12%) e etanol (14,24 %).

Nesse método, as condições de temperatura, o uso de solvente fresco, o ciclo do solvente e também as interações solvente/soluto contribuem para a extração das matérias-primas, ou seja, temperaturas mais elevadas reduzem a tensão superficial e a viscosidade do solvente, que atinge facilmente os espaços matriciais que contêm os solutos de interesse facilitando sua solubilização e também aumentando o número de componentes solúveis na fase solvente (MARKOM et al., 2007). Este fato justifica os altos rendimentos obtidos por este método de extração.

A influência da polaridade dos solventes utilizado no Soxhlet também precisa ser levada em consideração. Maiores rendimentos foram obtidos quando solventes de alta a intermediária polaridade foram usados, sugerindo que as matrizes vegetais estudadas são formadas principalmente por componentes de intermediária a alta polaridade.

Andrade et al. (2014) apresentaram um rendimento de extração de 25,13 % para extratos de folhas de yacon e 44,77 % para extratos das flores obtidos por Soxhlet com metanol por 72 hs. Este valor é superior aos resultados obtidos com o mesmo método de extração, no entanto, o tempo de extração utilizado no presente trabalho é muito menor (6 hs) que no trabalho de Andrade et al. (2014). Além disso, estudos têm mostrado a necessidade de redução do uso de solvente orgânicos (hexano, metanol, cloreto de metileno, etc.), que devido à sua toxicidade têm efeitos indesejáveis no meio ambiente e na qualidade e segurança dos alimentos e outros produtos finais. Esta preocupação ultrapassou os círculos acadêmicos, o que é evidente a partir da política ambiental e legislação da União Européia para o período de 2010 - 2050, onde a redução de solvente perigosos na indústria é uma das prioridades. Por essa razão, tecnologias de extração que usam solventes seguros e não tóxicos (tais como água, dióxido de carbono e etanol) foram introduzidas e aplicadas para a extração de vários materiais e compostos (BUBALO et al., 2018).

Um teste preliminar foi realizado utilizando scCO₂ puro a 50 °C e 20 MPa (ensaio 0) neste trabalho para as folhas e flores, no entanto, baixos rendimentos de

extração (0,27 e 1,72 %) foram observados, indicando que o scCO₂ puro é ineficiente para extração dessas matrizes. Portanto, etanol e etanol-água foram utilizados, com base nos resultados obtidos a partir da extração de Soxhlet, como alternativas promissoras associadas ao scCO₂ visando melhorar os rendimentos de extração.

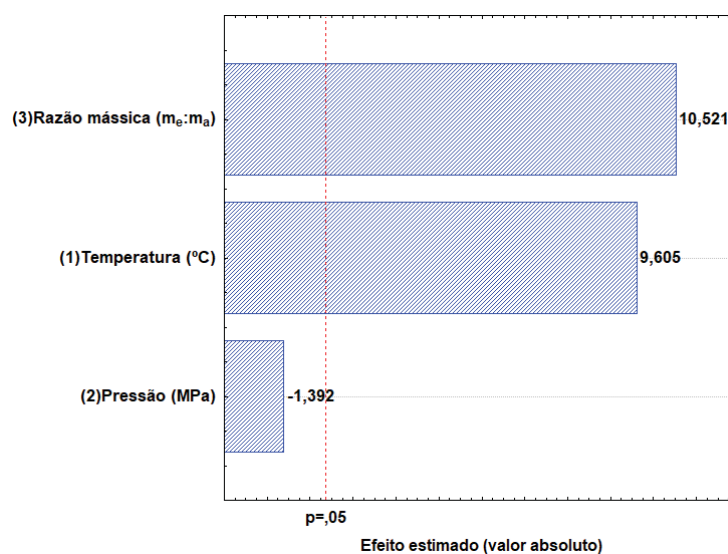
Na TABELA 8, pode-se observar que a presença de etanol e etanol-água aumentou significativamente a extração das folhas e flores de yacon quando comparado com scCO₂ puro, levando a rendimentos de extração superiores a 5 % para as folhas e 19 % para as flores. Os rendimentos das folhas são ainda inferiores aos resultados obtidos por Soxhlet, mas os rendimentos das flores são somente menores que os resultados obtidos por Soxhlet com etanol-água e metanol, porém vale ressaltar que a quantidade de etanol e etanol-água utilizada com scCO₂ na ESC é muito menor que a quantidade utilizada no Soxhlet. Além disso, os extratos supercríticos são obtidos (aproximadamente 5 vezes) mais rápido que os extratos obtidos por Soxhlet.

Ao utilizar a matéria-prima umedecida com solvente orgânico (etanol e etanol-água), o scCO₂ atua como veículo para o solvente orgânico, minimizando a resistência à transferência de massa e melhorando o contato entre os solutos e o solvente orgânico. Este comportamento resulta em altos rendimentos usando pequenas quantidades de solvente orgânico. Os ensaios 12 e 13 mostram que quando a mistura scCO₂ + etanol foi modificada para scCO₂ + etanol-água, o rendimento dos extratos das flores aumentou independentemente da temperatura utilizada, mas para as folhas o rendimento aumentou na menor temperatura (30 °C) porém diminuiu na maior temperatura (70 °C). Segundo Pourmortazavi e Hajimirsadeghi (2007), em algumas matrizes a água em excesso atua como solvente e compete com o scCO₂ por algumas substâncias, diminuindo a recuperação do extrato.

Os maiores rendimentos de extração para as folhas e flores (5,22 e 19,43 %) foram obtidos a 70 °C/ 25 MPa/ MR 3:1, correspondendo aos maiores valores de temperatura, pressão e razão mássica utilizando etanol para as folhas e etanol-água para as flores. Os menores rendimentos para essas matrizes (2,32 e 2,94 %) foram obtidos a 30 °C/ 25 MPa/ MR 1:1. Estes resultados são apresentados pelo gráfico de Pareto (FIG. 17 e 18) que ilustra a influência das variáveis independentes sobre o

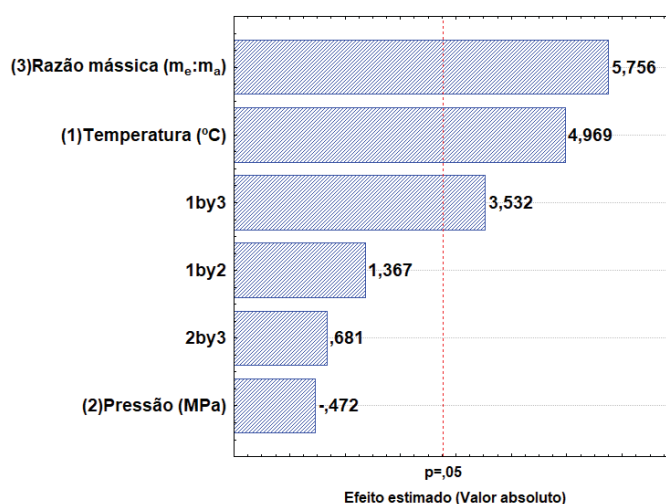
rendimento, mostrando que a razão mássica e temperatura são as variáveis estatisticamente mais significativas no processo de extração. Ambas as variáveis revelaram efeitos positivos, por exemplo, aumentando a razão mássica e a temperatura, o rendimento de extração aumenta consequentemente. Isso corrobora com achados anteriores da literatura de Cruz et al. (2017), Mazzutti et al. (2017), Fetzer et al. (2018) e Rodriguez et al. (2018) para diferentes matérias primas.

FIGURA 17 – GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NO RENDIMENTO DAS FOLHAS DE YACON



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 18 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NO RENDIMENTO DAS FLORES DE YACON



FONTE: A autora (2019).

A adição de um cossolvente como etanol ou etanol-água ao scCO_2 reduz a seletividade do processo, mas melhora o rendimento da extração aumentando a solubilidade de compostos polares da matriz (HERRERO et al., 2006).

O desempenho da extração em condições isobáricas é afetado principalmente pela temperatura devido a dois fatores: a pressão de vapor do soluto e a densidade do solvente. De fato, um aumento na temperatura leva a um aumento na pressão de vapor do soluto, aumentando sua solubilidade no solvente; no entanto, a densidade do solvente diminui quando a temperatura é aumentada (CARERI et al., 2001).

Segundo Box e Wetz (1973) e Neto et al. (2010), para uma regressão ser não apenas estatisticamente significativa, mas também útil para os meios preditivos, o valor de $F_{\text{calculado}}$ deve ser pelo menos 4 a 5 vezes maior que o F_{tabelado} .

As TABELAS 9 e 10 mostram a análise de variância (ANOVA) para o rendimento das extrações das folhas e flores de yacon usando scCO_2 + etanol, respectivamente.

TABELA 9 - ANOVA PARA O RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON USANDO scCO_2 + ETANOL

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F_{cal}	F_{tab}
Regressão	8,25	3	2,75	68,30	4,35
Erro	0,28	7	0,04	$R^2=0,97$	
Total	8,53	10			

SQ: SOMA QUADRÁTICA; GL: GRAU DE LIBERDADE, MQ: MÉDIA QUADRÁTICA, F: TESTE DE FISHER.

FONTE: A autora (2019).

Para as folhas, os resultados obtidos neste trabalho levaram a um modelo preditivo significativo, pois um bom ajuste ($R^2 = 0,97$) foi alcançado com o $F_{\text{calculado}}$ 15,70 vezes maior que o F_{tabelado} obtido na tabela de distribuição de Fisher, usando $\alpha = 0,05$, $DF_{\text{regressão}} = 3$ e $DF_{\text{residual}} = 7$ (NETO et al., 2010). Como o modelo é estatisticamente significativo e preditivo, foi possível gerar a equação do modelo e realizar uma superfície de resposta para identificar facilmente as regiões que apresentam os maiores rendimentos nas extrações das folhas de yacon.

TABELA 10 - ANOVA PARA O RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON USANDO scCO₂ + ETANOL

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	52,13	6	8,69	12,14	6,16
Erro	2,86	4	0,71	R²=0,95	
Total	54,99	10			

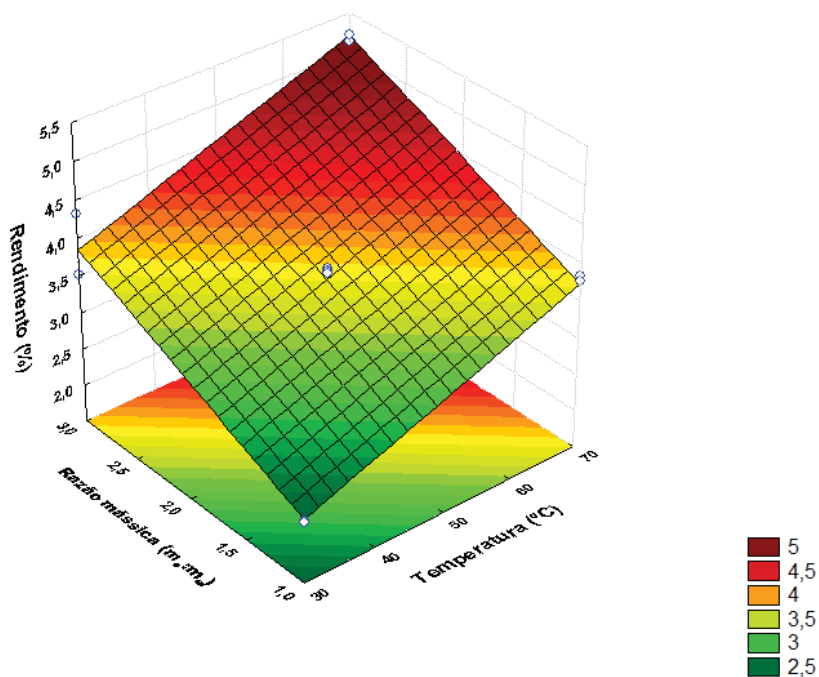
SQ: SOMA QUADRÁTICA; GL: GRAU DE LIBERDADE, MQ: MÉDIA QUADRÁTICA, F: TESTE DE FISHER.

FONTE: A autora (2019).

Para as flores, os resultados obtidos neste trabalho não levaram a um modelo estatisticamente significativo e preditivo, pois não foi alcançado um bom ajuste ($R^2 = 0,95$) com o $F_{\text{calculado}}$ somente 1,97 vezes maior que o F_{tabelado} obtido na tabela de distribuição de Fisher, usando $\alpha = 0,05$, $DF_{\text{regressão}} = 6$ e $DF_{\text{residual}} = 4$ (NETO et al., 2010). Dessa forma, não foi possível gerar a equação do modelo e realizar uma superfície de resposta para as extrações das flores de yacon.

A superfície de resposta das extrações das folhas de yacon (FIGURA 19), ilustra que o maior rendimento está localizado a 70 °C e razão mássica 3:1.

FIGURA 19 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE RAZÃO MÁSSICA E TEMPERATURA NO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE YACON



FONTE: A autora (2019).

A EQUAÇÃO 14 representa o modelo do comportamento de rendimento dos extratos de folhas de yacon obtidos com scCO_2 + etanol.

$$R = 0,98 + 0,03T + 0,75RM \quad (14)$$

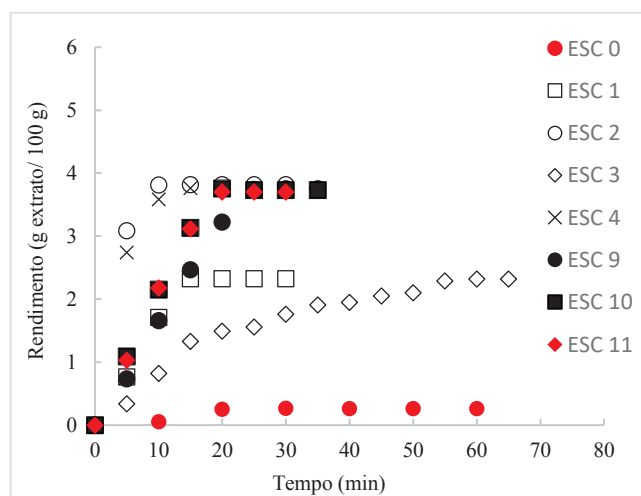
Onde, T é a temperatura (°C) e RM é a razão mássica de etanol para o sólido.

4.3 CURVAS DE EXTRAÇÃO

As curvas cinéticas das extrações das folhas e flores de yacon utilizando scCO_2 , scCO_2 + etanol e scCO_2 + etanol-água são apresentadas nas FIGURAS 20 - 23.

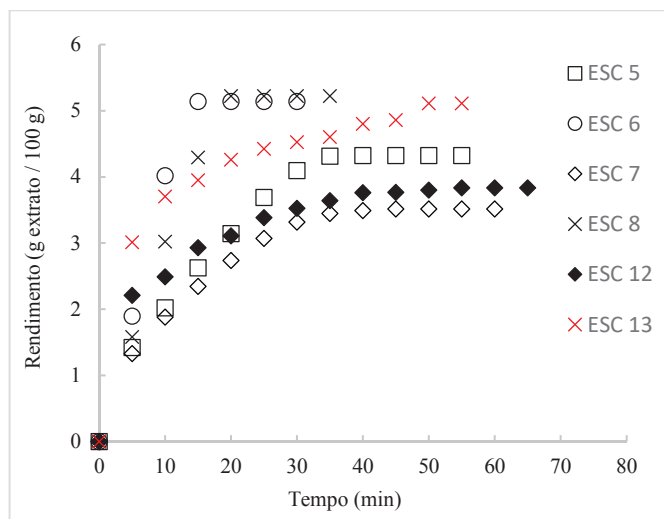
Em geral, pode-se observar a partir das curvas de extração obtidas neste estudo que a extração de compostos de folhas e flores de yacon usando apenas scCO_2 (ensaio 0) como solvente não é eficiente, mas com a adição de um solvente polar (etanol e etanol-água, neste caso) aumenta-se significativamente a solubilidade dos compostos na mistura de solventes (scCO_2 + EtOH) melhorando a extração de compostos polares.

FIGURA 20 - CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS PARA EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE YACON USANDO scCO_2 : ESC 0 (50 °C/ 20 MPa) E USANDO scCO_2 + ETANOL: ESC 1 (30 °C/ 15 MPa/ MR 1:1), ESC 2 (70 °C/ 15 MPa/ MR 1:1), ESC 3 (30 °C/ 25 MPa/ MR 1:1), ESC 4 (70 °C/ 25 MPa/ MR 1:1), ESC 9-11 (50 °C/ 20 MPa/ MR 2:1)



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 21 - CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS PARA EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE YACON USANDO scCO_2 + ETANOL: ESC 5 (30 °C/ 15 MPa/ MR 3:1), ESC 6 (70 °C/ 15 MPa/ MR 3:1), ESC 7 (30 °C/ 25 MPa/ MR 3:1), ESC 8 (70 °C/ 25 MPa/ MR 3:1) E USANDO scCO_2 + ETANOL-ÁGUA: ESC 12 (30 °C/ 25 MPa/ MR 3:1), ESC 13 (70°C/ 25 MPa/ MR 3:1)

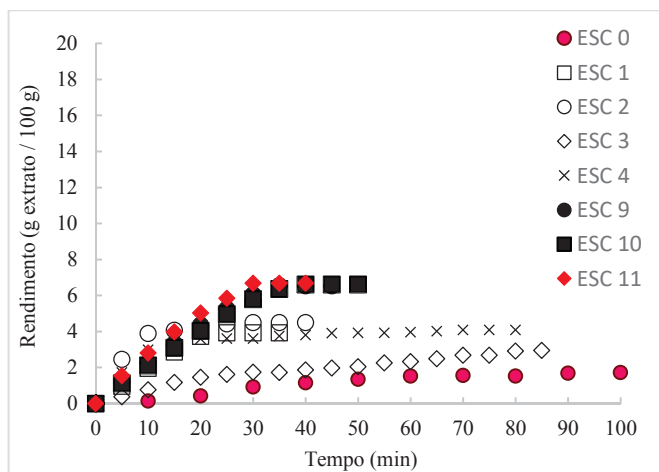


FONTE: A autora (2019).

Para as extrações das folhas de yacon (FIGURAS 20 e 21) pode-se observar que a maior taxa de extração inicial foi alcançada a 70 °C/ 15 MPa/ RM 1:1 (ensaio 2) e após 10 min a maior taxa de extração foi obtida a 70 °C/ 15 MPa/ RM 3:1 (ensaio 6). No entanto, após 20 minutos, a maior taxa de extração foi atingida a 70 °C/ 25 MPa/ RM 3:1 (ensaio 8), mantendo a maior taxa de extração até o final do processo. O ensaio 8 proporcionou a condição mais eficiente, uma vez que o extrato de folhas de yacon foi obtido com alta taxa de extração inicial, maior rendimento de extração (5,22 %) e maior porcentagem de extração (71,60 %).

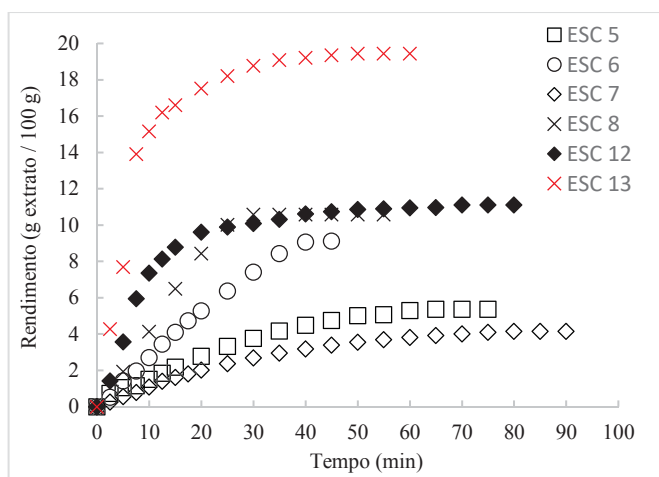
Para as extrações das flores de yacon (FIGURAS 22 e 23) a maior taxa de extração desde o início até o final do processo foi alcançada a 70 °C/ 25 MPa/ MR 3:1 usando scCO_2 + etanol-água (ensaio 13). Esse ensaio proporcionou a condição mais eficiente, uma vez que o extrato de flores de yacon foi obtido com alta taxa de extração inicial, maior rendimento de extração (19,43 %) e maior porcentagem de extração (136,45 %).

FIGURA 22 - CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS PARA EXTRAÇÃO DE FLORES DE YACON USANDO scCO_2 : ESC 0 (50 °C/ 20 MPa) E scCO_2 + ETANOL: ESC 1 (30 °C/ 15 MPa/ MR 1:1), ESC 2 (70 °C/ 15 MPa/ MR 1:1), ESC 3 (30 °C/ 25 MPa/ MR 1:1), ESC 4 (70 °C/ 25 MPa/ MR 1:1), ESC 9-11 (50 °C/ 20 MPa/ MR 2:1)



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 23 - CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS PARA EXTRAÇÃO DE FLORES DE YACON USANDO scCO_2 + ETANOL: ESC 5 (30 °C/ 15 MPa/ MR 3:1), ESC 6 (70 °C/ 15 MPa/ MR 3:1), ESC 7 (30 °C/ 25 MPa/ MR 3:1), ESC 8 (70 °C/ 25 MPa/ MR 3:1) E USANDO scCO_2 + ETANOL-ÁGUA: ESC 12 (30 °C/ 25 MPa/ MR 3:1), ESC 13 (70°C/ 25 MPa/ MR 3:1)



FONTE: A autora (2019).

A maioria das curvas demonstra uma característica não convencional quando comparada à extração usando fluido supercrítico puro. Os três períodos de extração denominados taxa de extração constante (CER), taxa de extração decrescente (FER) e período controlado difusivo (DCP) foram observados apenas

para extrações das folhas realizadas a 30 °C/ 25 MPa/ RM 1:1 (ensaio 3) e a 30 °C/ 25 MPa/ RM 3:1 (ensaio 7) e das flores obtidas a 50 °C/20 MPa/ RM 2:1 (ponto central), 70 °C/ 25 MPa/ RM 3:1 (ensaio 8) e 70 °C/ 15 MPa/ RM 3:1 (ensaio 6). Para os outros ensaios, a taxa de extração inicial aumentou e, em seguida, a recuperação do extrato estagnou. Este comportamento indica que nos primeiros minutos de extração o processo foi conduzido por interações entre cossolvente (etanol e etanol-água) e moléculas de soluto e assim a transferência de massa diminuiu à medida que a concentração de cossolvente no extrator também diminuiu. O mesmo comportamento é semelhante ao observado por Fetzer et al. (2018) em seu estudo de extração supercrítica usando scCO₂ com cossolvente.

Os resultados do rendimento de extração demonstraram o bom desempenho da scCO₂ com o cossolvente na recuperação de extratos de folhas e flores de yacon, embora o rendimento máximo tenha sido alcançado pelo método convencional Soxhlet.

4.4 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAL (TFT)

O TFT, determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e expresso em equivalentes de ácido gálico (GAE), encontrado nos extratos de folhas e flores de yacon obtidos pelos diferentes métodos de extração são apresentados na TABELA 11.

Segundo Vasco et al. (2008) extratos com valores de TFT abaixo 1 mg GAE/g possui baixo teor de compostos fenólicos, valores de 1 a 5 mg GAE/g possui médio teor e acima de 5 mg GAE/g possui alto teor de compostos fenólicos.

Os maiores TFT alcançados pelo scCO₂ + cossolvente para as folhas foram 39,59 mg GAE/g_{extrato} a 70 °C/ 15 Mpa/ MR 3:1 e 70 °C/ 25 Mpa/ MR 3:1 e para as flores foram 36,01 mg GAE/g_{extrato} a 70 °C/ 15 Mpa/ MR 3:1. Por outro lado, os menores TFT foram de 28,34 mg GAE/g_{extrato} obtido a 30 °C/ 25 Mpa/ MR 1:1 para as folhas e 14,18 mg GAE/g_{extrato} a 30 °C/ 15 Mpa/ MR 1:1 para as flores. Esses resultados mostram que todos os ensaios supercríticos apresentaram alto teor de compostos fenólicos segundo Vasco et al. (2008).

TABELA 11 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAL (TFT), EXPRESSOS EM EQUIVALENTES DE ÁCIDO GÁLICO (GAE), PARA O EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON

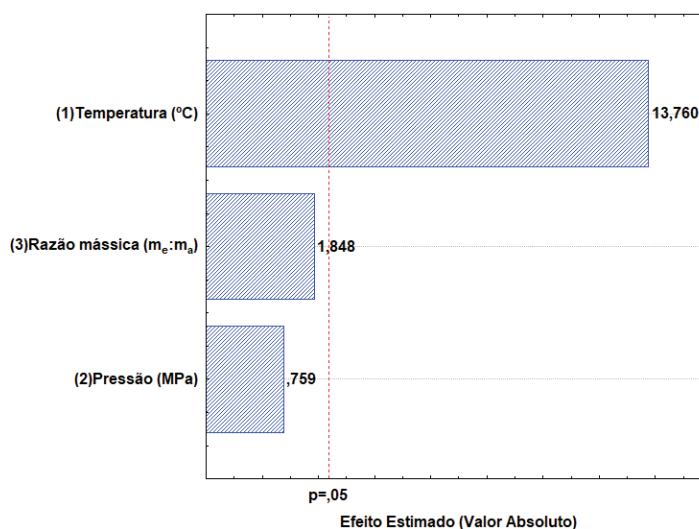
Ensaio	Método de extração ¹	Parâmetros de processo			TFT ² (mg GAE/g _{extrato}) ⁽¹⁾	
		T (°C)	P (MPa)	RM (m _e :m _a)	Folhas	Flores
1	ESC SC-CO ₂ + etanol	30	15	1:1	29,34 ± 4,24 ^{efg}	14,18 ± 2,02 ^e
2		70	15		37,34 ± 7,07 ^{cde}	19,43 ± 2,02 ^{de}
3		30	25		28,34 ± 0,1 ^{fg}	16,35 ± 1,00 ^e
4		70	25		38,84 ± 0,71 ^{cd}	22,6 ± 0,5 ^d
5		30	15	3:1	29,09 ± 0,35 ^{efg}	18,76 ± 1,15 ^{de}
6		70	15		39,59 ± 0,35 ^{bcd}	36,01 ± 0,29 ^c
7		30	25		30,68 ± 1,04 ^{efg}	17,93 ± 0,76 ^{de}
8		70	25		39,59 ± 0,35 ^{bcd}	34,93 ± 0,76 ^c
9		50	20	2:1	32,3 ± 0,7 ^{defg}	33,34 ± 0,71 ^c
10		50	20		34,09 ± 1,06 ^{def}	32,09 ± 0,35 ^c
11		50	20		32,68 ± 1,61 ^{defg}	35,68 ± 3,55 ^c
12	ESC SC-CO ₂ + etanol – água	30	25	3:1	16,60 ± 1,06 ^h	34,09 ± 2,25 ^c
13	70	25	26,59 ± 1,77 ^{fg}		23,35 ± 0,87 ^d	
	Baixa pressão	Solventes				
14	Soxhlet	Etanol-água			69 ± 0,76 ^a	70,50 ± 1,15 ^a
15		Metanol			42,51 ± 2,31 ^{bc}	36,01 ± 0,76 ^c
16		Etanol			47,59 ± 1,06 ^b	45,67 ± 4,16 ^b
17		Acetato de etila			25,34 ± 3,53 ^g	18,35 ± 0,50 ^{de}

¹ESC: EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA. ²LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇA SIGNIFICATIVA AO NÍVEL DE 5 % ($P < 0,05$).

FONTE: A autora (2019).

Os resultados referente às folhas podem ser explicados pelo gráfico de Pareto (FIGURA 24) que representa a influência das variáveis sobre o TFT.

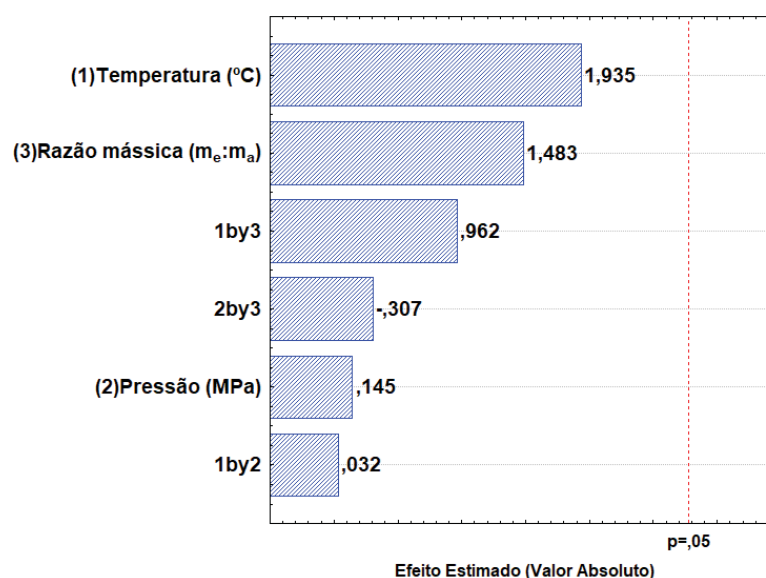
FIGURA 24 – GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NO TFT DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON OBTIDOS USANDO SC-CO₂ + ETANOL



O gráfico mostra que a temperatura é o parâmetro mais influente na extração total de compostos fenólicos. A temperatura tem um efeito positivo, mostrando que temperaturas mais altas levam a uma maior extração de TFT. Rodriguez et al. (2018) também encontraram altos valores de TFT em extratos de raiz de bardana obtidos por ESC a 70 °C e Souza et al.(2018) em extratos de folhas de bardana que é da mesma família que o yacon obtidos por ESC a 80 °C.

Para as flores, a FIGURA 25 mostra que as variáveis independentes não influenciaram o TFT. Não existem resultados na literatura sobre extratos das flores de yacon obtidos por ESC, porém, esse comportamento foi similar ao encontrado por Czaikoski et al. (2015) em extratos supercríticos de flores de *Eupatorium intermedium* que é da mesma família do yacon. Além desse, Souza et al. (2018) encontraram resultados semelhantes para extratos também da mesma família obtidos por ESC e Souza et al. (2019) encontraram resultados inferiores para extratos obtidos por extração de líquidos pressurizados (PLE).

FIGURA 25 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NO TFT DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON OBTIDOS USANDO scCO_2 + ETANOL



FONTE: A autora (2019).

As TABELAS 12 e 13 apresentam a ANOVA para o TFT dos extratos das folhas e flores de yacon usando scCO_2 + etanol.

TABELA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON USANDO scCO₂ + ETANOL

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	183,43	3	61,14	64,45	4,35
Erro	6,64	7	0,95	R²=0,97	
Total	190,07	10			

SQ: SOMA QUADRÁTICA; GL: GRAU DE LIBERDADE, MQ: MÉDIA QUADRÁTICA, F: TESTE DE FISHER.

FONTE: A autora (2019).

A ANOVA para o TFT dos extratos das folhas mostrou que os resultados obtidos levaram a um modelo preditivo significativo com um bom ajuste ($R^2 = 0,97$). O $F_{\text{calculado}}$ foi 14,82 vezes maior que o F_{tabelado} obtido na tabela de distribuição de Fisher, com $\alpha = 0,05$, $DF_{\text{regressão}} = 3$ e $DF_{\text{residual}} = 7$ (NETO et al., 2010). Como o modelo é estatisticamente significativo e preditivo, foi possível gerar a equação do modelo (EQ. 15) e realizar a superfície de resposta (FIGURA 24) para avaliar as regiões que apresentam valores de TFT mais proeminentes.

TABELA 13 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON USANDO scCO₂ + ETANOL

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	488,18	6	81,36	1,16	6,16
Erro	279,53	4	69,88	R²=0,64	
Total	767,70	10			

SQ: SOMA QUADRÁTICA; GL: GRAU DE LIBERDADE, MQ: MÉDIA QUADRÁTICA, F: TESTE DE FISHER.

FONTE: A autora (2019).

Para as flores, os resultados obtidos neste trabalho não levaram a um modelo estatisticamente significativo e preditivo, pois não foi alcançado um bom ajuste ($R^2 = 0,64$) com o $F_{\text{calculado}}$ menor que o F_{tabelado} obtido na tabela de distribuição de Fisher, usando $\alpha = 0,05$, $DF_{\text{regressão}} = 6$ e $DF_{\text{residual}} = 4$ (NETO et al., 2010). Dessa forma, não foi possível gerar a equação do modelo e realizar uma superfície de resposta para o TFT das flores de yacon.

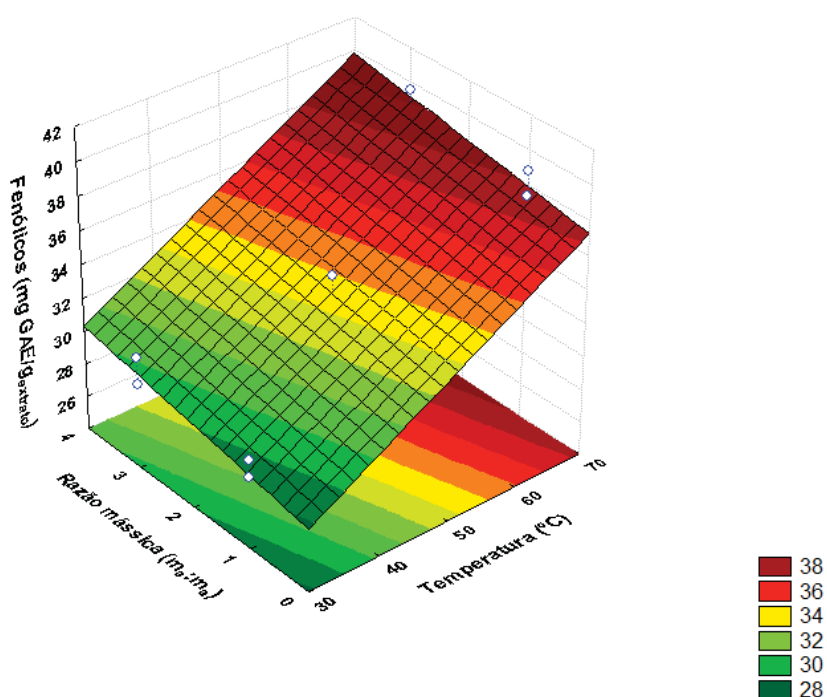
A EQUAÇÃO 15 representa o modelo do comportamento TFT dos extratos de folhas de yacon obtidos usando scCO₂ + etanol.

$$TFT = 19,65 + 0,24T \quad (15)$$

Onde, T é a temperatura (°C).

A partir do gráfico da superfície de resposta (FIG. 26) para TFT das folhas, variando a razão mássica e temperatura, verificou-se que 70 °C e razão mássica 3:1 forneceram o maior valor de TFT.

FIGURA 26 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NO TFT DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON OBTIDOS USANDO scCO₂ + ETANOL



FONTE: A autora (2019).

Em relação ao Soxhlet, os maiores TFT foram obtidos quando utilizou-se etanol-água como solvente (69 e 70,50 mg GAE/g_{extrato}) seguido de etanol (47,59 e 45,67 mg GAE/g_{extrato}) para as folhas e flores, respectivamente. O bom desempenho desses solventes sugere a presença de compostos de média a alta polaridade

nessas matrizes devido à polaridade dos solventes (5,2 para etanol e 7,1 para etanol-água) ter favorecido maiores extrações de fenólicos.

Para as folhas, o resultado obtido com etanol-água é superior ao encontrado por Andrade et al., (2014) para extratos de folhas de yacon obtidos por decocção com água (42,2 mg GAE/g_{extrato}), porém os obtidos com etanol e metanol são semelhantes. Para as flores, todos os resultados obtidos são superiores ao encontrados por Andrade et al., (2014) para extratos de flores de yacon independente do solvente e método de extração utilizado.

Segundo Roginsky e Lissi (2005) o teor de compostos fenólicos têm influência na atividade antioxidante de produtos naturais, entretanto eles não caracterizam completamente essa atividade, representando apenas um indicativo dessa propriedade. Segundo Valentová e Ulrichová (2003) e Andrade et al. (2014) a atividade antioxidante dos extratos de folhas e flores de yacon é influenciada pelo conteúdo de fenólicos e flavonóides, também conhecidos como antioxidantes naturais. Ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido ferúlico, rutina e miricetina foram os compostos encontrados nos extratos de folhas e flores de yacon.

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA)

4.5.1 Método do radical DPPH

A TABELA 14 apresenta os resultados da AA encontrada nos extratos de folhas e flores de yacon determinado pelo método DPPH. A AA foi apresentada em termos de EC₅₀, que expressa a concentração mínima efetiva para o antioxidante reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH. Uma alta atividade antioxidante para o método DPPH é indicada por um baixo valor de EC₅₀, portanto, quanto menor o EC₅₀, maior a AA da amostra.

TABELA 14 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Método de extração ¹		Parâmetros de processo		EC ₅₀ - DPPH (µg/mL) ^{2,4}		
		T (°C)	P (MPa)	RM (m _e :m _a)	Folhas	Flores
ESC	SC-CO ₂ + etanol	30	15	1:1	189 ± 11 ^{efgh}	557,0 ± 1,4 ^d
		70	15		178,1 ± 0,6 ^{gh}	466,3 ± 5,8 ^e
		30	25		270,9 ± 2,1 ^a	683,6 ± 3,6 ^a
		70	25		236,5 ± 5,4 ^b	597,0 ± 0,8 ^c
		30	15	3:1	243,0 ± 2,1 ^b	571,8 ± 0,2 ^d
		70	15		202,5 ± 3,0 ^{cde}	245,8 ± 2,3 ⁱ
		30	25		260,5 ± 0,3 ^a	634,4 ± 0,2 ^b
		70	25		189,0 ± 2,0 ^{efgh}	345,7 ± 8,5 ^g
		50	20	2:1	191,1 ± 2,9 ^{efg}	427,7 ± 7,2 ^f
		50	20		212,9 ± 1,8 ^{cd}	420,9 ± 3,7 ^f
50	20	185 ± 4 ^{fgh}	425,3 ± 2,7 ^f			
ESC	SC-CO ₂ + etanol – água	30	25	3:1	273,4 ± 5,8 ^a	177,2 ± 1,0 ^j
		70	25		215,4 ± 2,8 ^c	268,9 ± 2,6 ^h
Baixa pressão		Solventes				
Soxhlet		Etanol-água			159,7 ± 2,1 ⁱ	98,6 ± 1,4 ^k
		Metanol			196,8 ± 1,7 ^{def}	179,9 ± 3,5 ^j
		Etanol			148 ± 1 ⁱ	179,3 ± 0,4 ^j
		Acetato de etila			174,9 ± 1,3 ^h	600,47 ± 1,4 ^c

¹ESC: EXTRAÇÃO SUPERCRTICA. ²CONCENTRAÇÃO EFETIVA (EC) PARA OBTENÇÃO DE 50 % DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE. ³ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE A TROLOX (TEAC) EM µM TEAC/ G_{EXTRATO}. ⁴LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇA SIGNIFICATIVA AO NÍVEL DE 5 % ($P < 0,05$).

FONTE: A autora (2019).

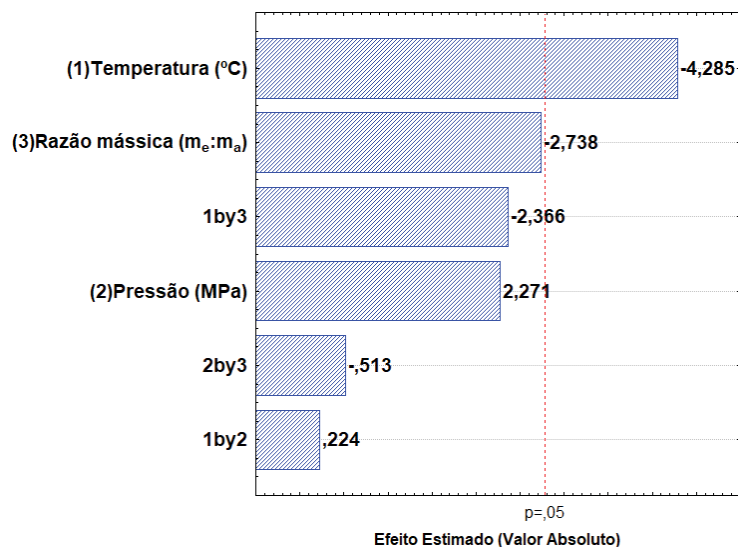
Para as folhas, os melhores resultados de EC₅₀ foram obtidos por Soxhlet com etanol (148 µg/mL) e com etanol-água (159,7 µg/mL) sem diferença significativa ($p < 0,05$) e para as flores, os melhores resultados foram obtidos utilizando etanol-água (98,6 µg/mL) seguido por etanol (179,3 µg/mL). Esse comportamento evidencia que os solventes de polaridade intermediária e alta aplicados nas extrações favoreceram a solubilização de compostos com AA, detectáveis pelo método de DPPH. Isso pode ser explicado pelo fato do radical DPPH apresentar inacessibilidade estérica para moléculas grandes, como é o caso da maioria dos compostos lipídicos, sendo assim, menos eficiente para a determinação da AA desses materiais (OLIVEIRA et al., 2016).

As AA dos extratos obtidos usando scCO₂ + cossolvente para as folhas não apresentaram efeito significativo na temperatura, pressão ou razão mássica. Os melhores resultados de EC₅₀ foram obtidos a 70 °C/ 15 MPa/ RM 1:1 (178,1 µg/mL) e 50 °C/ 20 MPa/ MR 2:1 (185 µg/mL). Segundo Campos et al. (2008) extratos com

valores de EC_{50} abaixo de 250 $\mu\text{g/mL}$ são considerados bons antioxidantes. Portanto todos os ensaios para as folhas apresentaram boa AA.

Para as flores, a FIGURA 27 mostra que a temperatura foi a única variável independente que apresentou efeito significativo na AA pelo método DPPH.

FIGURA 27 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NA AA DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON OBTIDOS USANDO scCO_2 + ETANOL



FONTE: A autora (2019).

A temperatura tem um efeito negativo, mostrando que temperaturas mais altas levam a um menor valor de EC_{50} , que para esse método, afeta positivamente a extração de AA. Comportamento similar foi encontrado por Souza et al. (2019), que também observou a maior AA em extrato da mesma família do yacon obtido por PLE na maior temperatura de trabalho utilizado.

A alteração do cossolvente etanol para etanol-água na extração supercrítica afetou positivamente a extração de antioxidantes, haja visto que o melhor resultado para as flores foi obtido a 30 $^{\circ}\text{C}$ / 25 MPa/ RM 3:1 usando etanol-água (177,2 $\mu\text{g/mL}$) e sendo considerado bom antioxidante (Campos et al., 2008). Esse comportamento evidencia mais uma vez, que os solventes de polaridade intermediária e alta aplicados nas extrações favoreceram a solubilização de compostos com AA detectáveis por esse método.

A TABELA 15 apresenta a ANOVA para AA determinada pelo método DPPH dos extratos de flores de yacon usando scCO₂ + etanol.

TABELA 15 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON USANDO scCO₂ + ETANOL

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	157719,28	6	26286,55	6,15	6,16
Erro	17083,2	4	4270,79	R²=0,90	
Total	174802,5	10			

SQ: SOMA QUADRÁTICA; GL: GRAU DE LIBERDADE, MQ: MÉDIA QUADRÁTICA, F: TESTE DE FISHER.

FONTE: A autora (2019).

Para as flores, os resultados obtidos neste trabalho não levaram a um modelo estatisticamente significativo e preditivo, pois não foi alcançado um bom ajuste ($R^2 = 0,90$) com o $F_{\text{calculado}}$ menor que o F_{tabelado} . Dessa forma, não foi possível gerar a equação do modelo e realizar uma superfície de resposta para AA determinada pelo método DPPH das flores de yacon.

A determinação da AA dos extratos foi complementada com a utilização de outro método de avaliação, apresentado a seguir.

4.5.2 Método do radical ABTS

Esta análise teve o objetivo de verificar a capacidade dos extratos das folhas e flores do yacon em sequestrar o radical cation (ABTS⁺), comparado a uma curva analítica de um antioxidante padrão (Trolox). A quantidade de moléculas de radicais ABTS⁺ consumida devido à reação com compostos antioxidantes é expressa em capacidade antioxidante em Trolox equivalentes (TEAC), ou seja, quanto maior concentração TEAC, mais antioxidante é o extrato analisado.

A TABELA 16 apresenta os resultados da AA encontrada nos extratos de folhas e flores de yacon determinado pelo método ABTS.

TABELA 16 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Método de extração ¹		Parâmetros de processo		ABTS ⁴ (µM TEAC/g _{extrato}) ³		
		T (°C)	P (MPa)	RM (m _e :m _a)	Folhas	Flores
ESC	SC-CO ₂ + etanol	30	15	1:1	97,0 ± 0,2 ^f	378,6 ± 1,6 ^{ab}
		70	15		167,0 ± 2,2 ^d	397,9 ± 3,0 ^a
		30	25		109,1 ± 2,0 ^f	170,4 ± 0,04 ^g
		70	25		197,6 ± 0,2 ^c	291,7 ± 2,1 ^{de}
		30	15	3:1	160,2 ± 0,4 ^d	378,1 ± 0,5 ^{ab}
		70	15		195,4 ± 0,4 ^c	322,3 ± 1,1 ^{cd}
		30	25		158,4 ± 0,04 ^d	319,1 ± 3,0 ^{cde}
		70	25		189,1 ± 1,2 ^c	337,8 ± 26,8 ^c
		50	20	2:1	163,3 ± 0,6 ^d	349,5 ± 7,1 ^{bc}
		50	20		162,8 ± 0,07 ^d	340,1 ± 13,3 ^c
50	20	161,8 ± 0,01 ^d	330,7 ± 2,7 ^c			
ESC	SC-CO ₂ + etanol – água	30	25	3:1	132,9 ± 0,03 ^e	348,1 ± 8,9 ^{bc}
		70	25		166,6 ± 1,4 ^d	190,7 ± 2,1 ^g
Baixa pressão		Solventes				
Soxhlet		Etanol-água			221,9 ± 2,1 ^b	391,5 ± 0,1 ^a
		Metanol			282,7 ± 0,3 ^a	285,6 ± 0,5 ^e
		Etanol			269,0 ± 0,5 ^a	377,0 ± 1,5 ^{ab}
		Acetato de etila			163,9 ± 0,9 ^d	243,3 ± 1,2 ^f

¹ESC: EXTRAÇÃO SUPERCRTICA. ²CONCENTRAÇÃO EFETIVA (EC) PARA OBTENÇÃO DE 50 % DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE. ³ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE A TROLOX (TEAC) EM µM TEAC/ G_{EXTRATO}. ⁴LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇA SIGNIFICATIVA AO NÍVEL DE 5 % ($P < 0,05$).

FONTE: A autora (2019).

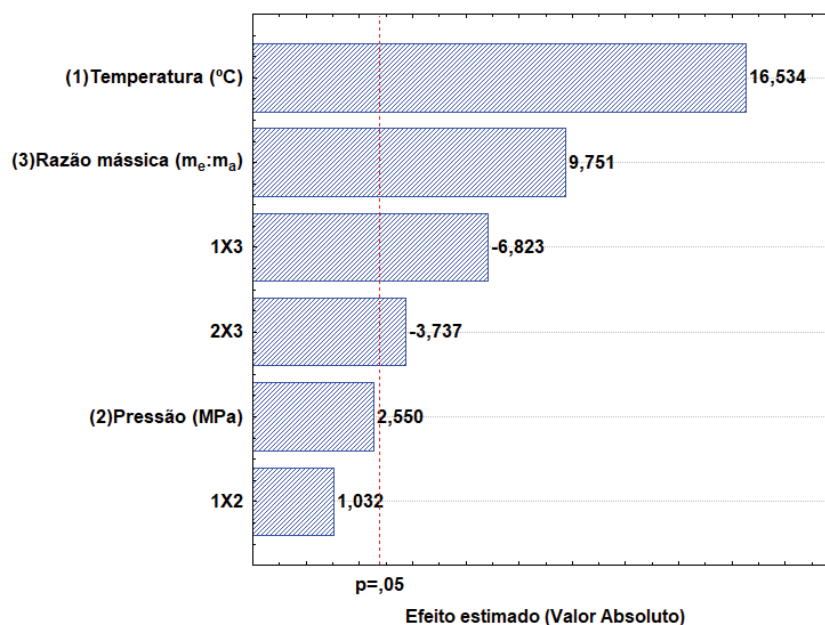
Para as folhas, os extratos obtidos por Soxhlet com metanol e etanol proporcionaram os maiores resultados (282,7 e 269 µM TEAC/g_{extrato}, respectivamente) sem diferença significativa ($p < 0,05$).

Em relação às extrações usando scCO₂ + cossolvente, os maiores valores de ABTS para as folhas foram 197,6 e 195,4 µM TEAC/g_{extrato} obtido a 70 °C/ 25 MPa/ RM 1:1 e 70 °C/ 15 MPa/ RM 3:1, respectivamente. Estes resultados podem ser explicados pelo gráfico de Pareto (FIGURA 28) que ilustra a influência das variáveis independentes no método ABTS, mostrando que a temperatura e a razão mássica são as variáveis mais influentes na extração de antioxidantes.

A temperatura e a razão mássica teve efeitos positivos, isto é, quando ambas as variáveis aumentam a AA do extrato da folha aumenta. Este fato é explicado pelo aumento da polaridade do solvente devido à adição de etanol que

aumenta o poder de solvatação dos compostos polares, enfatizando a AA dos extratos (SANTOS et al., 2017).

FIGURA 28 – GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NO ENSAIO ANTIOXIDANTE ABTS DOS EXTRATOS DE FOLHAS OBTIDOS USANDO $scCO_2$ + ETANOL



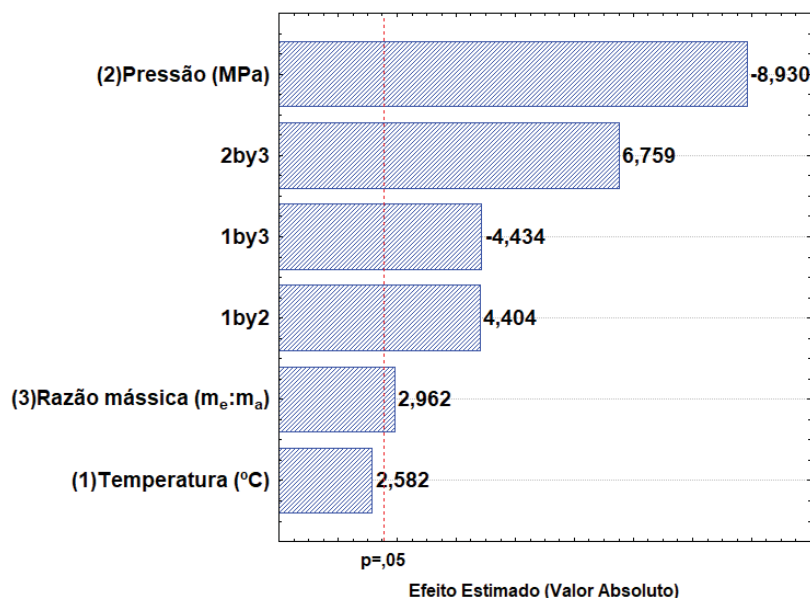
FONTE: A autora (2019).

Para as flores, os melhores resultados foram encontrados nos extratos obtidos por Soxhlet com etanol-água ($391,5 \mu\text{M TEAC/g}_{\text{extrato}}$), Soxhlet com etanol ($377 \mu\text{M TEAC/g}_{\text{extrato}}$) e usando $scCO_2$ + cossolvente obtido a 30°C / 15 MPa / RM 1:1 ($378,6 \mu\text{M TEAC/g}_{\text{extrato}}$) e a 30°C / 15 MPa / RM 3:1 ($378,1 \mu\text{M TEAC/g}_{\text{extrato}}$) também sem diferença significativa ($p < 0,05$).

A AA pelo método ABTS apresentou bons resultados tanto para os extratos obtidos por Soxhlet quanto para os extratos obtidos com $scCO_2$, comparativamente com o método DPPH. Esse comportamento já era esperado, pois o método ABTS é uma metodologia recomendada para medir as atividades de compostos de natureza tanto hidrofílica quanto lipofílica (Re et al., 1999).

Os resultados referente às flores podem ser explicados pelo gráfico de Pareto (FIGURA 29), que mostra a pressão, sua interação com a razão mássica e interação da temperatura com a razão mássica sendo os parâmetros mais influentes na extração de antioxidantes.

FIGURA 29 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NO ENSAIO ANTIOXIDANTE ABTS DOS EXTRATOS DE FLORES OBTIDOS USANDO SCCO₂ + ETANOL



FONTE: A autora (2019).

As TABELAS 17 e 18 apresentam a ANOVA para a AA pelo método ABTS dos extratos das folhas e flores de yacon usando scCO₂ + etanol.

TABELA 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON USANDO scCO₂ + ETANOL

Fonte de variação	de	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regressão		10069,18	6	1678,20	72,76	6,16
Erro		92,26	4	23,07	R²=0,99	
Total		10161,44	10			

SQ: SOMA QUADRÁTICA; GL: GRAU DE LIBERDADE, MQ: MÉDIA QUADRÁTICA, F: TESTE DE FISHER.

FONTE: A autora (2019).

A ANOVA para ABTS dos extratos das folhas mostrou que os resultados obtidos levaram a um modelo preditivo significativo de um bom ajuste ($R^2 = 0,99$). O $F_{\text{calculado}}$ foi 11,81 vezes maior que o F_{tabelado} obtido na tabela de distribuição de Fisher, com $\alpha = 0,05$, $DF_{\text{regressão}} = 6$ e $DF_{\text{residual}} = 4$ (NETO et al., 2010).

TABELA 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON USANDO scCO_2 + ETANOL

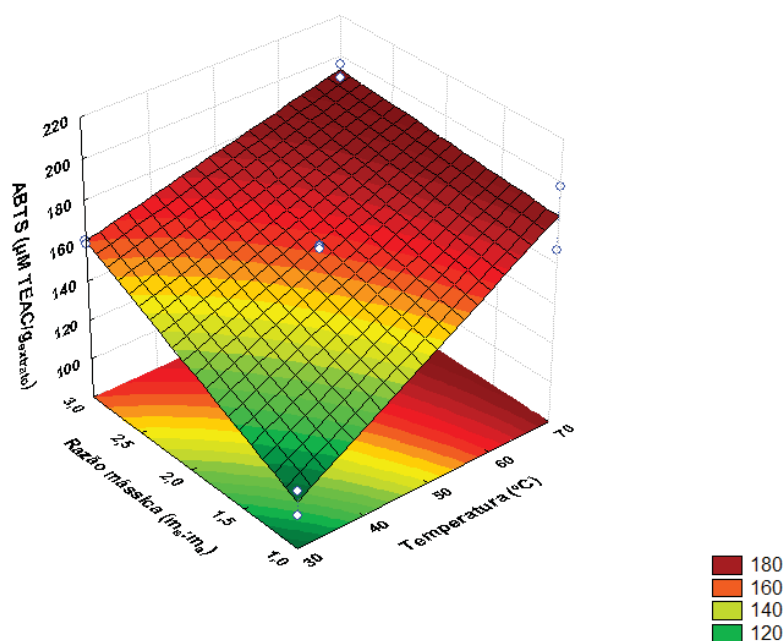
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F_{cal}	F_{tab}
Regressão	36126,34	6	6021,06	29,99	4,35
Erro	803,07	4	200,77	$R^2=0,98$	
Total	36929,41	10			

SQ: SOMA QUADRÁTICA; GL: GRAU DE LIBERDADE, MQ: MÉDIA QUADRÁTICA, F: TESTE DE FISHER.

FONTE: A autora (2019).

A ANOVA para ABTS dos extratos das flores mostrou que os resultados obtidos levaram a um modelo preditivo significativo de um bom ajuste ($R^2 = 0,98$). O $F_{\text{calculado}}$ foi 6,9 vezes maior que o F_{tabelado} obtido na tabela de distribuição de Fisher, com $\alpha = 0,05$, $DF_{\text{regressão}} = 6$ e $DF_{\text{residual}} = 4$ (NETO et al., 2010). Dessa forma foi possível gerar a equação do modelo e a superfície de resposta (FIGURAS 30 e 31) para ambas as matrizes.

FIGURA 30 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE A RAZÃO MÁSSICA E TEMPERATURA NO ENSAIO ANTIOXIDANTE ABTS DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON OBTIDOS USANDO scCO_2 + ETANOL



FONTE: A autora (2019).

A superfície de resposta para ABTS das folhas de yacon mostra que a melhor faixa de temperatura e razão mássica para recuperação de antioxidantes é de 60 – 70 °C e RM 3:1, respectivamente.

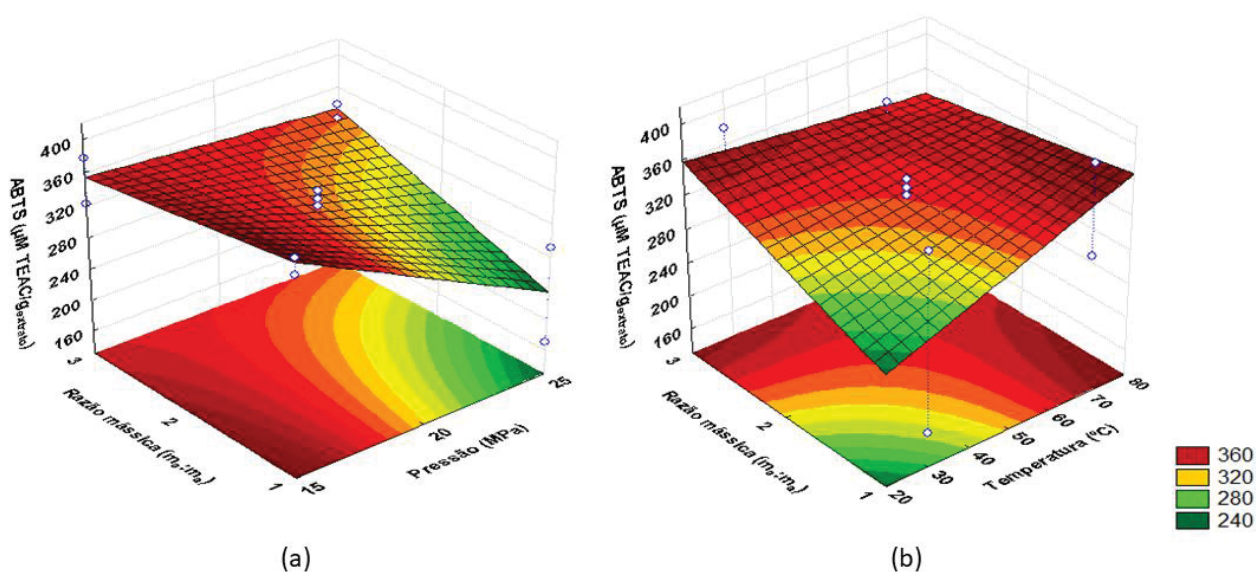
A EQUAÇÃO 16 representa o modelo de comportamento para o método antioxidante ABTS de extratos de folhas de yacon obtidos usando scCO₂ + etanol.

$$ABTS = 2,21T + 70,90RM - 0,58T \times RM - 0,13P \times RM \quad (16)$$

Onde, T é a temperatura (°C), P é a pressão (MPa) e RM é a razão mássica de etanol para sólido.

Na FIGURA 31a analisando as variáveis pressão e razão mássica na AA das flores de yacon, verificou-se que em pressões abaixo de 20 MPa independente da RM obteve-se altos valores de AA, e na FIGURA 31b, pôde-se observar que as maiores AA foram encontradas nas maiores temperaturas e RM estudadas. Esse comportamento com relação à temperatura e RM também foi observado nos resultados do método DPPH.

FIGURA 31 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON OBTIDOS USANDO SCCO₂ + ETANOL



FONTE: A autora (2019).

A EQUAÇÃO 17 representa o modelo de comportamento para o método antioxidante ABTS de extratos de flores de yacon obtidos usando scCO₂ + etanol.

$$ABTS = 826,14 - 33,52P - 0,22T \times P - 1,11T \times RM + 6,77P \times RM \quad (17)$$

Onde, P é a pressão (Mpa), T é a temperatura (°C) e RM é a razão mássica de etanol para sólido.

Os resultados dos ensaios de TFT e AA (DPPH e ABTS) para os extratos de folhas e flores de yacon mostrou de média a alta AA independente do método de extração empregado.

Estes resultados indicam uma boa eficiência das misturas scCO₂ + etanol e scCO₂ + etanol-água na obtenção de extratos antioxidantes. Esta propriedade foi relatada anteriormente por diversos autores que avaliaram matérias-primas como sementes de tamarindo, butiá, e maracujá (POURMORTAZAVI E HAJIMIRSADEGUI, 2007; REIS et al., 2016; CRUZ et al., 2017), bagaço de laranja e uva (BENELLI et al., 2010; PEREIRA et al., 2017) e plantas medicinais como *Arctium lappa*, *Plantago major* e *Plantago lanceolata* (MAZUTTI et al., 2017; SOUZA et al., 2018, SOUZA et al., 2019).

4.6 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

A análise de composição de ácidos graxos foi realizada somente nos extratos de folhas de yacon e é detalhada na TABELA 19. Pode-se notar a presença de ácidos graxos saturados (AGS) com concentração relativa variando de 36,29% para o extrato obtido usando scCO₂ + etanol a 50 °C/ 20 Mpa/ MR 2:1 (9) a 71,05 % obtido a 70 °C/ 15 Mpa/ MR 1:1 (2). Os AGS mais representativos nos extratos de folhas de yacon são os ácidos behênico e palmítico.

TABELA 19 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON

Ácido graxo	Símbolo	Área de retenção (%)														
		Condição de extração ¹														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	14	15	16	17		
Ácido Láurico	C12:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,42	-	-		
Ácido Mirístico	C14:0	-	-	-	-	-	-	-	4,63	-	-	-	21,45	-		
Ácido																
Pentadecanóico	C15:0	0,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Ácido Palmítico	C16:0	16,24	27,85	21,61	18,72	1,16	18,77	15,31	19,42	15,63	30,92	29,23		17,16		
Ácido Palmítico	C16:1	0,38	-	0,63	0,15	-	-	-	3,48	2,55	-	3,22	-	2,35		
Ácido Margárico	C17:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,96	-		
Ácido Estearico	C18:0	1,15	1,83	2,83	2,92	-	2,82	3,49	3,51	3,11	9,38	5,29	-	3,17		
Ácido Oleico	C18:1 n9c	0,66	-	4,52	5,15	-	2,83	2,87	2,86	2,18	4,33	3,23	-	2,19		
Ácido Linoleico	C18:2 n6c	1,14	2,21	5,90	7,85	0,55	11,00	6,34	10,10	11,47	12,16	8,91	-	8,95		
Ácido gama - Linolênico	C18:3 n6	2,72	6,64	20,77	21,45	3,01	35,95	13,04	30,87	39,26	19,62	18,99	38,95	25,89		
Ácido Eicosanóico	C20:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,64	-		
Ácido	C20:3 n6	1,93	-	-	-	1,92	-	-	-	-	-	-	-	-		
Eicosatrienóico																
Di-homo-alfa- linolênico	C20:3 n3	-	-	-	-	0,76	-	-	-	-	23,59	-	-	-		
Ácido eicosapentaenóico	C20:5 n3 EPA	2,46	5,41	6,04	10,07	1,10	11,05	17,49	7,40	8,25	-	23,71	-	7,45		
Ácido	C21:0	-	-	-	-	0,58	-	-	-	-	-	-	-	-		
Heneicosanóico																
Ácido Behênico	C22:0	36,13	41,36	37,7	33,69	66,65	17,58	41,46	17,73	17,55	-	-	-	32,84		
Ácido	C22:2	7,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Eicosadienoico																
Ácido	C22:6 n3 DH	22,10	-	-	-	0,58	-	-	-	-	-	-	-	-		
Docosahexadienoico (DHA)																
Ácido Nervônico	C24:1	6,88	14,70	-	-	23,69	-	-	-	-	-	-	-	-		
AGS ²	-	53,93	71,05	62,1	55,33	68,4	39,17	60,26	45,29	36,29	40,3	41,94	61,05	53,17		
AGI ³	-	46,07	28,95	37,9	44,67	31,6	60,83	39,74	54,71	63,71	59,7	58,06	38,95	46,83		

¹: ESC (30 °C, 15 MPa e RM 1:1); ²: ESC (70 °C, 15 MPa e RM 3:1); ³: ESC (30 °C, 25 MPa e RM 1:1); ⁴: ESC (70 °C, 25 MPa e RM 1:1); ⁵: ESC (30 °C, 15 MPa e RM 3:1); ⁶: ESC (70 °C, 15 MPa e RM 3:1); ⁷: ESC (30 °C, 25 MPa e RM 3:1); ⁸: ESC (70 °C, 25 MPa e RM 3:1); ⁹: ESC (50 °C, 20 MPa e RM 2:1); ¹⁴: SOXHLET ETANOL-ÁGUA; ¹⁵: SOXHLET METANOL; ¹⁶: SOXHLET ETANOL; ¹⁷: SOXHLET ACETATO DE ETILA. ²AGS: ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS. ³AGI: ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS.

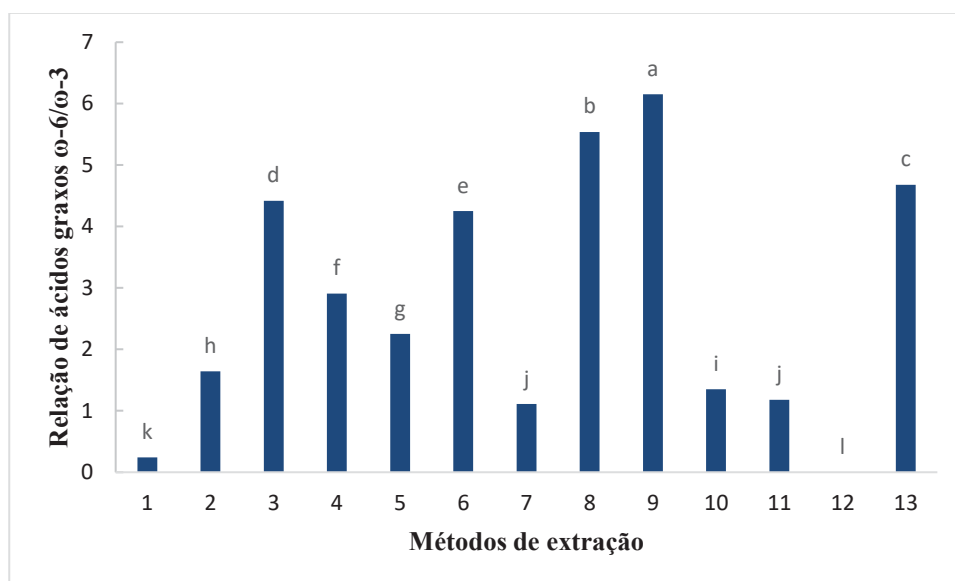
A concentração relativa dos ácidos graxos insaturados (AGI) obtidos usando scCO_2 + etanol variou de 31,6% a 30 °C/ 15 MPa/ MR 3:1 (5), até 63,71% a 50 °C/ 20 MPa/ MR 2:1 (9). De acordo com os resultados apresentados na TABELA 19, os ácidos gama-linolênico (ω -6), eicosapentaenóico (ω -3) e linoleico (ω -6) foram os principais AGIs, especialmente γ -linolênico devido ao alto conteúdo encontrado em todas as amostras independente do método de extração utilizado.

Em relação às extrações obtidas a altas pressões, pode -se observar que na menor RM (1:1) a pressão teve maior influência nas extrações dos ácidos linoleico e γ -linolênico. No entanto, usando valores mais elevados de RM, os resultados mostraram que a temperatura apresentou maior efeito nas extração desses compostos. Além disso, ao analisar o efeito da RM na extração, aumentando a quantidade de etanol adicionada à matéria-prima, a extração desses ácidos insaturados aumentou. Os extratos obtidos a 50 °C/ 20 MPa/ RM 2:1 e por Soxhlet com etanol apresentaram os maiores valores de ácido γ -linolênico com 39,26 e 38,95 %, respectivamente.

Os grupos ω -3 e ω -6 não são sintetizados no corpo humano então eles devem ser obtidos pela alimentação, e entre os AGIs, os ácidos linoleicos são conhecidos como capazes de reduzir os níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e LDL- colesterol, diminuindo o risco de arteriosclerose, câncer e doenças alérgicas (LEE et al., 2002). Segundo a Organização da Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura e a Organização Mundial de Saúde para a manutenção da saúde, uma razão de ω -6/ ω -3 na dieta humana deve estar compreendida entre 5 - 10. A FIGURA 32 apresenta a razão de ácidos graxos ω -6/ ω -3 achada nos extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração (FAO e WHO, 1994).

Os resultados revelaram um bom valor nutricional para os extratos, principalmente para uma fonte natural de ω -6. A melhor relação de ácidos graxos ω -6/ ω -3 foi encontrada nos extratos obtidos usando scCO_2 + etanol a 50 °C/ 20 MPa/ RM 2:1, a 70 °C/ 25 MPa/ RM 3:1 e soxhlet com acetato de etila com valores de 6,15, 5,54 e 4,68.

FIGURA 32 – RELAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO. NÚMEROS DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO REFEREM-SE ÀS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO NA TAB. 19



FONTE: A autora (2019).

A TABELA 19 mostra que, embora diferentes técnicas tenham sido realizadas, assim como diferentes solventes e condições de operações também foram testadas, a quantidade de cada ácido graxo nos diferentes extratos apresentou pouca variação.

4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi realizada somente nos extratos de flores de yacon e é detalhado na TABELA 20. Devido à simplicidade e possibilidade de testar inúmeras bactérias e ao baixo custo, a difusão em disco apresenta vantagens em relação a outros métodos e tem sido amplamente utilizado para avaliar extrato de plantas. Além disso, existe uma alta correlação entre a evolução de bactérias *in vivo* e *in vitro*, pois é um método bastante visual (BALOUIRI et al. 2016). Cinco bactérias de interesse para a indústria de alimentos tem sido testadas aqui, já direcionando possíveis aplicações dos extratos obtidos.

TABELA 20 – POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS DE FLORES DE YACON

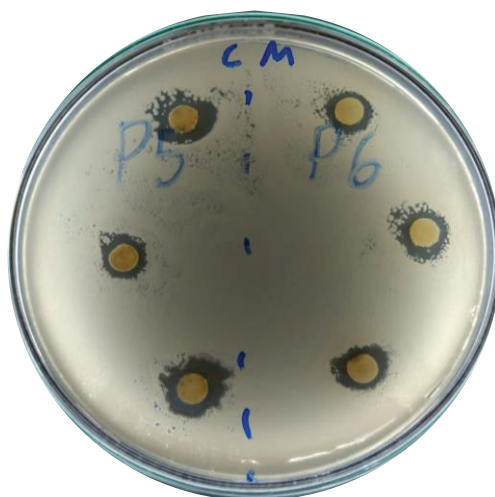
Condição de extração ¹	Bactérias Gram-positivas						Bactérias Gram-negativas					
	Staphylococcus. aureus	Clostridium perfringens	Listeria monocytogenes	Salmonella sp.	Escherichia coli		Staphylococcus. aureus	Clostridium perfringens	Listeria monocytogenes	Salmonella sp.	Escherichia coli	
	(mm)	(%)	(mm)	(%)	(mm)	(%)	(mm)	(%)	(mm)	(%)	(mm)	(%)
Antibiótico	29,86 ^a ± 0,84	28,37 ^a ± 1,66	28,37 ^a ± 0,95	28,94 ^a ± 1,28	28,88 ^a ± 0,48		29,86 ^a ± 0,84	28,37 ^a ± 1,66	28,37 ^a ± 0,95	28,94 ^a ± 1,28	28,88 ^a ± 0,48	
1	7,77 ^c ± 1,18	26,02	10,58 ^c ± 0,53	37,29	8,66 ^{def} ± 0,65	30,53	7,77 ^c ± 1,18	26,02	8,66 ^{def} ± 0,65	9,40 ^c ± 1,49	6,38 ^b ± 0,26	22,09
2	8,13 ^c ± 0,25	27,23	16,27 ^c ± 3,95	57,35	9,20 ^{def} ± 1,20	32,43	8,13 ^c ± 0,25	27,23	9,20 ^{def} ± 1,20	-	-	-
3	10,80 ^{ab} ± 2,97	36,17	-	-	11,32 ^{bcd} ± 0,20	39,90	10,80 ^{ab} ± 2,97	36,17	11,32 ^{bcd} ± 0,20	-	-	-
4	8,80 ^{bc} ± 0,49	29,47	-	-	11,49 ^{bcd} ± 0,72	40,50	8,80 ^{bc} ± 0,49	29,47	11,49 ^{bcd} ± 0,72	9,98 ^c ± 0,71	-	-
5	9,29 ^{bc} ± 0,41	31,11	10,86 ^c ± 1,14	38,28	10,85 ^{cdef} ± 1,29	38,24	9,29 ^{bc} ± 0,41	31,11	10,85 ^{cdef} ± 1,29	9,73 ^c ± 0,57	6,41 ^b ± 0,43	22,20
6	-	-	8,72 ^c ± 0,77	30,74	8,67 ^f ± 0,17	30,56	-	-	8,67 ^f ± 0,17	7,76 ^c ± 0,45	8,72 ^b ± 0,77	30,19
7	12,82 ^b ± 1,73	42,93	9,00 ^c ± 1,29	31,72	11,23 ^{bcd} ± 0,71	39,58	12,82 ^b ± 1,73	42,93	11,23 ^{bcd} ± 0,71	7,40 ^c ± 0,78	7,67 ^b ± 0,38	26,56
8	-	-	-	-	11,91 ^f ± 0,73	41,98	-	-	11,91 ^f ± 0,73	-	-	-
9	9,18 ^{bc} ± 0,34	30,74	6,83 ^c ± 0,64	24,07	14,09 ^b ± 0,73	49,67	9,18 ^{bc} ± 0,34	30,74	14,09 ^b ± 0,73	-	8,81 ^b ± 0,03	30,51
12	9,71 ^c ± 0,58	32,52	8,96 ^c ± 1,29	31,58	12,86 ^{bc} ± 2,11	45,33	9,71 ^c ± 0,58	32,52	12,86 ^{bc} ± 2,11	9,45 ^c ± 2,65	7,05 ^b ± 0,40	24,41
13	8,60 ^c ± 0,45	28,80	8,21 ^c ± 1,59	28,94	8,34 ^f ± 0,18	29,40	8,60 ^c ± 0,45	28,80	8,34 ^f ± 0,18	8,61 ^c ± 0,32	9,73 ^b ± 1,24	33,69
14	7,66 ^c ± 0,48	25,65	-	-	7,71 ^f ± 0,67	27,18	7,66 ^c ± 0,48	25,65	7,71 ^f ± 0,67	17,36 ^b ± 0,34	-	-
16	10,24 ^{bc} ± 1,29	34,29	7,52 ^b ± 0,66	26,51	7,83 ^{ef} ± 0,22	27,60	10,24 ^{bc} ± 1,29	34,29	7,83 ^{ef} ± 0,22	8,62 ^c ± 0,74	8,18 ^b ± 0,43	28,32

¹: ESC (30 °C, 15 MPa e RM 1:1); **2**: ESC (70 °C, 15 MPa e RM 1:1); **3**: ESC (30 °C, 25 MPa e RM 1:1); **4**: ESC (70 °C, 25 MPa e RM 1:1); **5**: ESC (30 °C, 15 MPa e RM 3:1); **6**: ESC (70 °C, 15 MPa e RM 3:1); **7**: ESC (30 °C, 25 MPa e RM 3:1); **8**: ESC (70 °C, 25 MPa e RM 3:1); **9**: ESC (50 °C, 20 MPa e RM 2:1); **12**: ESC (30 °C, 25 MPa e RM^{ETANOL-ÁGUA} 3:1); **13**: ESC (70 °C, 25 MPa e RM^{ETANOL-ÁGUA} 3:1); **14**: SOXHLET ETANOL-ÁGUA; **16**: SOXHLET ETANOL. FONTE: A autora (2019).

Em questão de efetividade, todos os extratos apresentaram halo de inibição para a bactéria *Listeria*, e de modo geral, as bactérias gram-positivas foram mais inibidas pelos diferentes extratos, em comparação com a inibição do antibiótico, que foi parecida para as 5 bactérias. Isso pode ser explicado pelo fato de que as bactérias gram-positivas não possuem uma membrana externa em sua estrutura e naturalmente apresentam menor resistência aos mecanismos preservativos e são acessíveis principalmente a moléculas pequenas (BRUL AND COOTE 1999), que contém nos extratos.

A FIGURA 33 ilustra uma foto da análise feita para os extratos 9 (P 5) e 12 (P 6) contra a bactéria *Listeria*. Esses dois extratos obtidos a alta pressão apresentaram o maior halo de inibição para essa bactéria.

FIGURA 33 – PLACA DE TESTE APRESENTANDO HALOS DE INIBIÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS NA CONDIÇÃO 9 (P5) E 12 (P6) PARA A BACTÉRIA *LISTERIA MONOCYTOGENES*



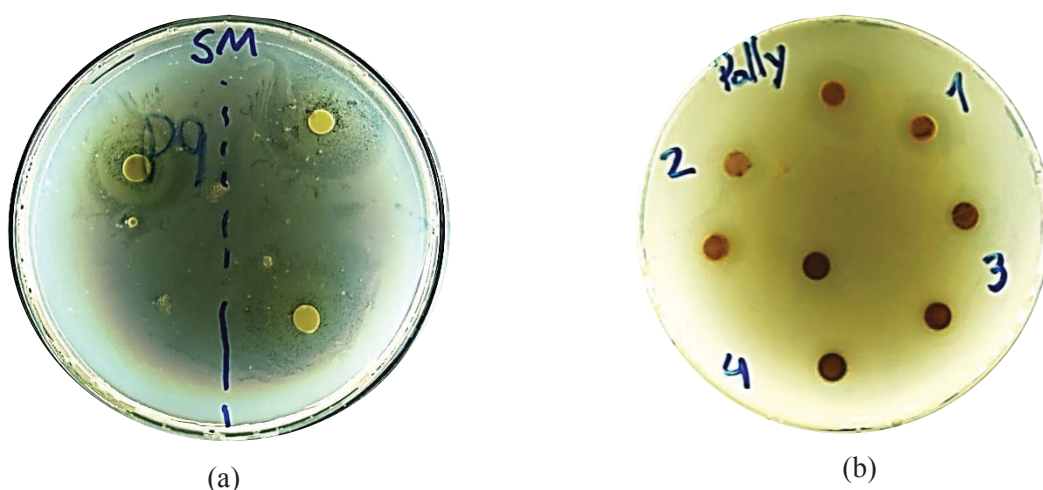
FONTE: A autora (2019).

Nota-se que com atividade frente a todas as bactérias testadas, os extratos 1, 5, 7, 12, 13 e 16 aparecem. Pode-se destacar que os 5 primeiros foram extraídos a alta pressão, o que pode indicar uma habilidade do scCO₂ de extrair compostos que atuam como agentes antimicrobianos e antioxidantes, o que possivelmente é devido à ausência de ar e luz durante o processo de extração que permite a preservação da bioatividade dos extratos (PALMA et al., 1999). Esse comportamento também foi apontado por Mesomo et al. (2013) com gengibre, Oliveira et al. (2016) com subprodutos de maracujá, Cruz et al. (2017) com semente de butiá e Souza et al. (2018) com folhas de bardana.

Não existem resultados na literatura para o potencial antimicrobiano de extratos da flor de yacon, obtidos por extração supercrítica. Czaikoski et al. (2015) obtiveram zonas de inibição (mm) semelhantes (10-20 mm) para a *Listeria* e *S. aureus*, utilizando extratos de flores da mesma família do yacon, o que corrobora o potencial dos extratos de flores desse tipo de planta. Além desse, Souza et al. (2018) encontraram resultado semelhante para extratos da mesma família, onde as bactérias gram-negativas se mostraram resistentes aos extratos supercríticos testados, e as maiores zonas de inibição apareceram nas menores temperaturas de extração para a bactéria gram-positiva *S. aureus*.

Dos extratos 14 e 16 obtidos por Soxhlet, apenas do 14 (etanol-água) (FIGURA 34a) conseguiu uma inibição considerável para a bactéria *Salmonella*, e pode ser considerada susceptível (S) ao extrato 14 de acordo com as faixas mínimas de inibição (The Clinical and Laboratory Standards Institute 2016), $\geq 17\text{mm}$ para a família *Enterobacteriaceae*. Se comparado com o antibiótico, nenhuma inibição alcançou seus valores de halo significativamente. Para *S. aureus*, a inibição promovida pelo extrato 7 (FIGURA 34b) pode ser considerada intermediária (12-17 mm).

FIGURA 34 - PLACAS DE TESTE APRESENTANDO HALOS DE INIBIÇÃO: (a) EXTRATO 14 PARA A BACTÉRIA *SALMONELLA* sp. E (b) EXTRATO 7 (1) PARA A BACTÉRIA *S. aureus*



FONTE: A autora (2019).

O potencial antimicrobiano verificado nos extratos pode estar associada a presença de compostos fenólicos, e ácidos graxos. O efeito inibitório dos compostos

fenólicos poderia ser explicado por sua interação com as proteínas da membrana bacteriana por meio de pontes de hidrogênio de seus grupos hidroxila que alterariam sua permeabilidade; ou ainda pela penetração dessas substâncias na célula bacteriana provocando a coagulação de seu conteúdo (OLIVEIRA et al., 2016).

Os resultados aqui apresentados indicam um potencial das flores de yacon para controle de crescimento microbiano, mas cabe ressaltar que são necessários estudos adicionais que envolvam outros microorganismos e aplicações diretas em sistemas de interesse, como alimentos.

4.8 FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS

4.8.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico (Dg) das gotículas das emulsões e do índice de polidispersividade (Pdl)

Na TABELA 21 são apresentados os resultados de Dg e os índices de polidispersividades (Pdl) para as emulsões feitas antes da encapsulação.

TABELA 21 - DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE DAS EMULSÕES

Ensaio	Dg (nm) ¹	Pdl ²
1	239 ± 3 ^c	0,254 ± 0,003 ^{ab}
2	259 ± 4 ^{ab}	0,294 ± 0,021 ^a
3	267,5 ± 1 ^a	0,212 ± 0,009 ^b
4	170 ± 4 ^d	0,259 ± 0,039 ^{ab}
5	252 ± 1 ^{bc}	0,156 ± 0,015 ^c
6	270,5 ± 5 ^a	0,146 ± 0,006 ^c
7	272 ± 2 ^a	0,122 ± 0,002 ^c

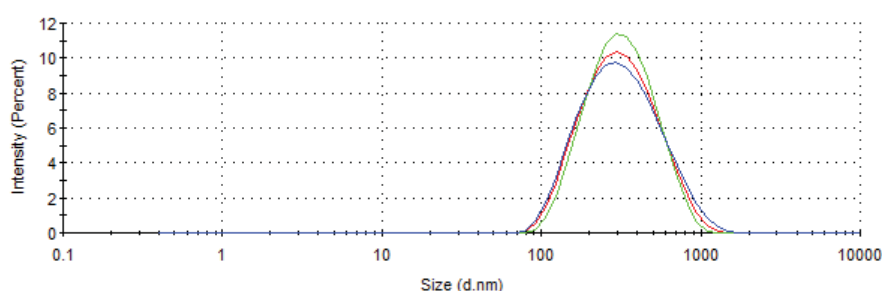
¹Dg = TAMANHO HIDRODINÂMICO DAS GOTÍCULAS DE EMULSÃO. ²Pdl = ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE.
FONTE: A autora (2019).

O Dg das emulsões variou de 170 a 272 nm com $p < 0,05$, indicando que todos os ensaios são considerados como miniemulsões. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), miniemulsão é uma emulsão na qual as gotículas da fase dispersa se situam entre 50 nm a 1 µm (SLOMKOWSKI et al., 2011). Apesar da variação entre os valores de Dg, todas as emulsões são consideradas semelhantes, pois estão dentro da faixa de miniemulsão. Resultados

semelhantes foram encontrados por Lima Reis et al. (2019) em seu estudo sobre emulsão de óleo essencial de folha de louro que utilizaram a mesma técnica para avaliar o Dg.

O Pdl mostra a homogeneidade da emulsão. Valores próximos de 0,1 indicam que o Dg apresentou pouca variação, enquanto valores próximos de 1,0 indica muita variação e consequentemente, baixa qualidade (sistema polidesperso) (JAFARI et al., 2008). O Pdl das miniemulsões formadas variou de 0,122 a 0,294, indicando alta qualidade das emulsões e resultando em uma distribuição mono modal homogênea, como pode ser visto na FIGURA 35 para o ensaio 3.

FIGURA 35 – DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO HIDRODINÂMICO DE GOTÍCULAS DA EMULSÃO PARA O ENSAIO 3 (9 MPa E 1,5 ML/MIN) (AS LINHAS REPRESENTAM A TRIPLICATA DA ANÁLISE)



FONTE: A autora (2019).

De acordo com Wang et al. (2016), os valores de Pdl e o Dg são cruciais para estabelecer a qualidade das partículas finais. Gotas menores distribuídas na emulsão aumentam a eficiência de encapsulamento dos compostos ativos (material encapsulado, isto é, extrato de folhas de yacon).

4.8.2 Eficiência de encapsulação (EE) e teor residual de acetato de etila (AE)

A TABELA 22 mostra os resultados da eficiência de encapsulação e teor residual do solvente orgânico nas diferentes combinações de pressão/vazão das emulsões estudadas e a FIGURA 36 mostra exemplos das partículas formadas pelo processo SFEE.

A EE das suspensões variou de 41,5 a 68,2%, sendo que as maiores eficiências foram encontradas nas suspensões obtidas na menor pressão (9 MPa)

(68,2 e 64,0 %). Percebe-se que o aumento da pressão diminuiu significativa a EE. Além disso, os resultados obtidos para o ponto central (ensaios 5, 6 e 7) indicam boa repetitividade dos experimentos sem diferença significativa para os valores de EE.

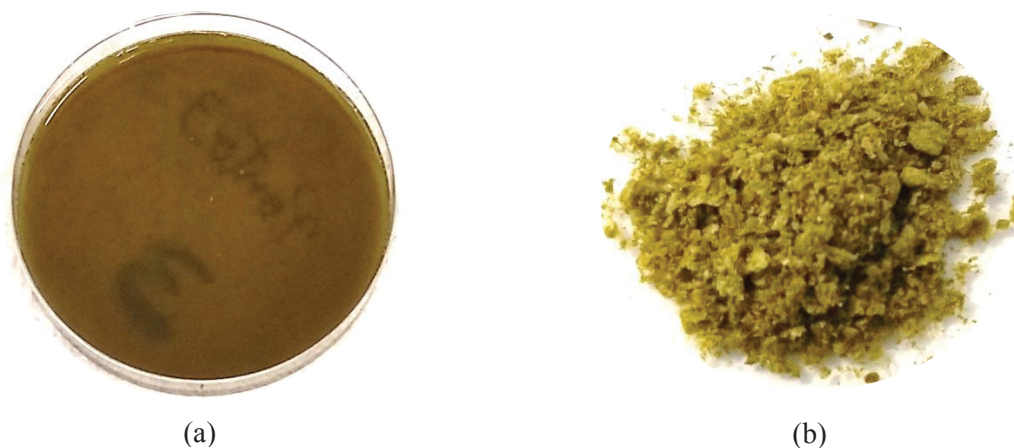
TABELA 22 – EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E TEOR RESIDUAL DE ACETATO DE ETILA DAS SUSPENSÕES

Ensaio	P (MPa) ¹	Q _E (mL/min) ²	EE (%) ^{3,5}	EA (ppm) ⁴
1	9	0,5	64,0 ^b	2871 ^d
2	13	0,5	48,6 ^c	6232 ^a
3	9	1,5	68,2 ^a	4588 ^c
4	13	1,5	41,5 ^d	459 ^e
5	11	1	56,5 ^e	4635 ^b
6	11	1	56,7 ^e	4633,5 ^b
7	11	1	56,3 ^e	4634 ^b

¹P = PRESSÃO. ²Q_E = VAZÃO DA EMULSÃO. ³EE = EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO. ⁴EA = CONTEÚDO RESIDUAL DE ACETATO DE ETILA. ⁵LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFFERENÇAS SIGNIFICATIVAS AO NÍVEL DE 5% (P < 0,05).

FONTE: A autora (2019).

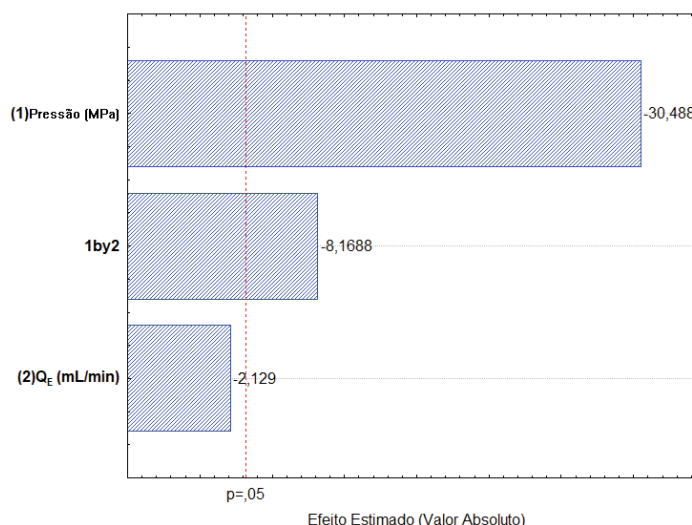
FIGURA 36 – AMOSTRAS DE PARTÍCULAS FORMADAS PELO PROCESSO SFEE: (a) SUSPENSÃO 3 E (b) SUSPENSÃO 3 SECA



FONTE: A autora (2019).

Estes resultados podem ser explicados pelo gráfico de Pareto (FIGURA 37) que ilustra a influência das variáveis independentes (P e Q_E) na EE. As variáveis pressão e a sua interação com a vazão influenciaram a EE pelo processo SFEE, enquanto a Q_E não apresentou efeito significativo ($p < 0,05$). A pressão e sua interação com a vazão revelaram efeitos negativos, por exemplo, diminuindo essas variáveis, a EE consequentemente aumenta.

FIGURA 37 – GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO



FONTE: A autora (2019).

Após a mistura da solução do extrato com solvente orgânico (acetato de etila) e o scCO₂ no processo SFEE, o fluido supercrítico satura o solvente orgânico, removendo-o da mistura por extração. A saturação do solvente orgânico pelo scCO₂ leva à precipitação do composto ativo por um efeito antissolvente (MATTEA et al., 2009).

O scCO₂ deve retirar o solvente orgânico sem remover o composto ativo e/ou o agente de encapsulação, a fim de permitir que o polímero envolva (circunde) corretamente o composto ativo. O fato das maiores pressões terem afetado negativamente a EE pode estar relacionado ao aumento da solubilidade do extrato no scCO₂ (com o aumento da pressão), resultando na remoção do extrato juntamente com o solvente orgânico.

A EQUAÇÃO 18 representa o modelo de comportamento de EE das suspensões obtidas por SFEE.

$$EE = 84,319 - 2,442 P + 29,55 Q_E - 2,82P \times Q_E \quad (18)$$

Onde, P é a pressão (MPa) and Q_E (mL/min) é a vazão da emulsão.

A TABELA 23 apresenta a ANOVA para a EE das suspensões obtidas por SFEE.

TABELA 23 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS SUSPENSÕES OBTIDAS POR SFEE

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	477,07	3	159,02	333,59	9,28
Erro	1,43	3	0,48	R²=0,99	
Total	478,50	6			

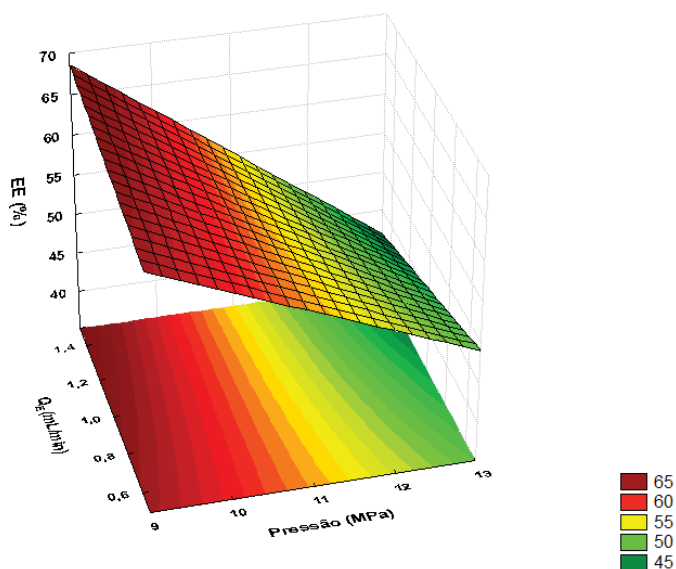
SQ: SOMA QUADRÁTICA; GL: GRAU DE LIBERDADE, MQ: MÉDIA QUADRÁTICA, F: TESTE DE FISHER.

FONTE: A autora (2019).

Os valores obtidos levaram a um modelo preditivo significativo, pois um bom ajuste ($R^2 = 0,99$) foi alcançado com F_{cal} 35,95 vezes maior que o F_{tab} obtido na tabela de distribuição de Fisher, usando $\alpha = 0,05$ (NETO et al., 2010). Como o modelo é estatisticamente significativo e preditivo, foi possível realizar uma superfície de resposta (FIGURA 38) para identificar facilmente as regiões com maior EE.

A superfície de resposta ilustra que as regiões ótimas para a encapsulação dos extratos de folhas de yacon estão localizadas nas pressões abaixo de 11 Mpa, independente da vazão da emulsão usada.

FIGURA 38 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA MOSTRANDO OS EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE PRESSÃO E VAZÃO DA EMULSÃO NA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO



FONTE: A autora (2019).

Os resultados de EE encontrados neste trabalho (41,5 a 68,2 %) foram semelhantes ao encontrados por Lima Reis et al. (2019) (56,5 a 80 %), Lévai et al. (2015) (65,7 a 70 %) e Santos et al. (2012) (34 a 89 %), que utilizaram a mesma técnica de avaliação da EE (UV-vis) para compostos ativos diferentes.

Em termos de solvente orgânico residual (acetato de etila), pode-se observar que o melhor resultado foi obtido para o ensaio 4 (459 ppm) e não houve um comportamento claro quanto a influência da pressão ou da vazão na remoção do solvente orgânico.

O acetato de etila é um solvente Classe 3 e o FDA limita seu uso a 5000 ppm, o que corresponde a 50 mg/dia (FDA, 2012). Os ensaios 1, 3, 4, 5, 6 e 7 apresentaram concentrações de solvente abaixo do limite legal. No entanto, o resultado do ensaio 2 (6232 ppm), realizado com 1,5 horas de tempo de secagem que está ligeiramente acima do limite do FDA, o que indica que é necessário um tempo maior na segunda etapa do processo SFEE.

Considerando os resultados obtidos para a EE e para a EA, os melhores resultados obtidos foram para as suspensões oriundas dos ensaios 1 e 3, realizadas na menor pressão estudada (9 MPa).

4.8.3 Potencial zeta das suspensões

Os resultados do potencial zeta das suspensões obtidas nas diferentes condições por SFEE são apresentadas na TABELA 24.

TABELA 24 – POTENCIAL ZETA DAS SUSPENSÕES OBTIDAS POR SFEE

Ensaio	Pressão (MPa) ¹	Emulsão (mL/min) ²	PZ (mV) ³
1	9	0,5	-26,6
2	13	0,5	-29,3
3	9	1,5	-29,4
4	13	1,5	-33,5
5	11	1,0	-30,8
6 (Sem extrato)	11	1,0	-7,67

¹P = PRESSÃO. ²Q_E = VAZÃO DA EMULSÃO. ³PZ = POTENCIAL ZETA

FONTE: A autora (2019).

O potencial zeta é um parâmetro importante para analisar a estabilidade de suspensões aquosas e representa o potencial elétrico no plano de cisalhamento

quando a partícula está em movimento sob ação de um campo elétrico. Os valores de potencial zeta estão relacionados à estabilidade das suspensões. Um potencial acima de 25 mV, em valor absoluto e à temperatura ambiente, está geralmente associado a uma solução eletrostaticamente estável (MIRHOSSEINI et al., 2008).

Todas as suspensões com o extrato atingiram a estabilidade e apresentaram valores negativos de potencial zeta, indicando que as superfícies das partículas exibem cargas predominantemente negativas, que podem ser atribuídas à presença de grupos funcionais do Hi-Cap, a exemplo da -OH (hidroxila) e do HC = O (aldeído) (LIMA REIS et al., 2019).

Quando a suspensão 5 é comparada à suspensão 6 (não possui o extrato de folha de yacon), pode – se notar um aumento do pontencial zeta com a presença do extrato, destacando que as interações das moléculas do amido com o extrato exerceram um efeito positivo na estabilidade da suspensão.

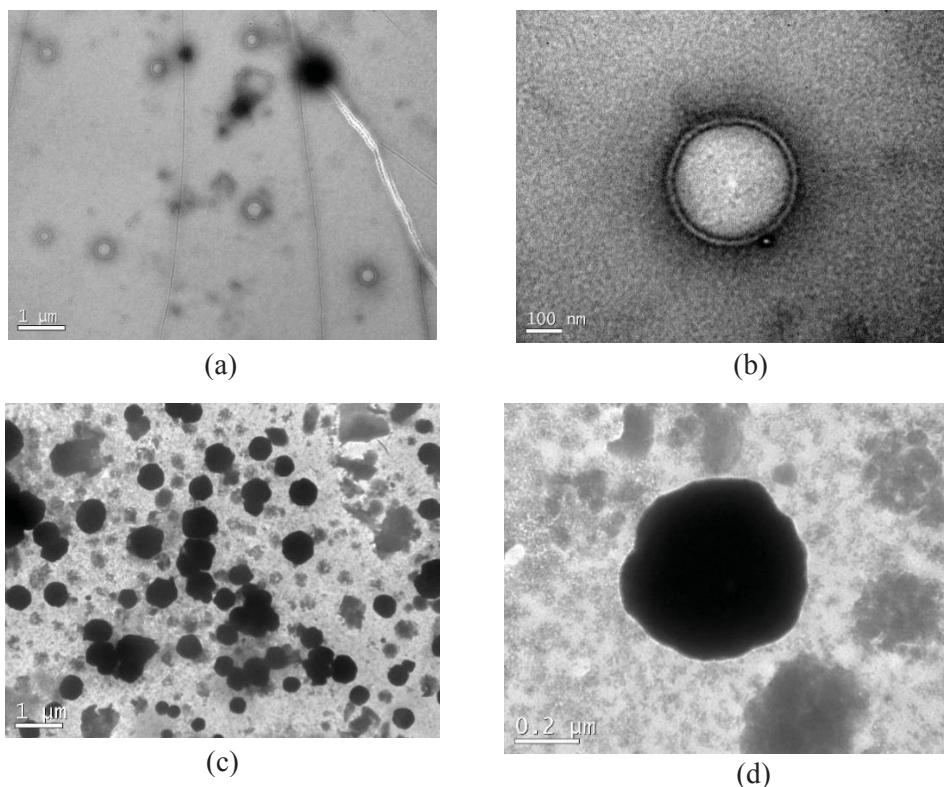
4.8.4 Morfologia e tamanho de partícula

A morfologia das partículas obtidas após o processo SFEE pode ser observada nas micrografias do MET, como apresentadas na FIGURA 39. Com exceção do ensaio 3, todas os outros apresentaram partículas com forma semelhante. Por esse motivo, apenas as imagens dos ensaios 3 e 4 foram selecionados para ampliação.

Todas as partículas são esféricas e apresentam uma superfície sem poros. A porosidade da partícula pode acelerar a liberação do princípio ativo e possivelmente indica uma baixa eficiência de encapsulação, uma vez que a presença de poros pode permitir a migração e perda do composto ativo durante o processo de encapsulação (ANDRADE et al., 2017).

No presente trabalho, foi possível observar a formação de microesferas em todos os ensaios, conforme mostrada pela Figura 39c e 39d. No ensaio 3 (9 Mpa e 1,5 mL/min), que corresponde a Figura 39a e 39b, foram observadas não apenas as microesferas, mas também as cápsulas. Essas cápsulas são aquelas com núcleo claramente concentrado na região central e circundadas por uma fina camada do agente encapsulante (amido), comprovando a ocorrência da encapsulação.

FIGURA 39 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS PARTÍCULAS SFEE: (a, b) ENSAIO 3 (9 MPa e 1,5 mL/min) E (c, d) ENSAIO 4 (13 MPa e 1,5 mL/min)



FONTE: A autora (2019).

O tamanho das partículas (D_p) variou de 92 a 450 nm, sendo classificado como micropartículas (SLOMKOWSKI et al., 2011). Esses valores estão de acordo com as medidas do DLS detalhadas na Tabela 15, exceto para o ensaio 4 (13 MPa e 1,5 mL/min), que apresentou um D_p de 450 nm. Estudos revelam que o tamanho de partícula de uma suspensão depende do tamanho de partícula da emulsão (CHATTOPADHYAY et al., 2006; MATTEA et al., 2009; SANTOS et al., 2012). Apenas uma ligeira aglomeração de partículas foi observado, enfatizando a estabilidade da suspensão, como confirmada pelo potencial zeta.

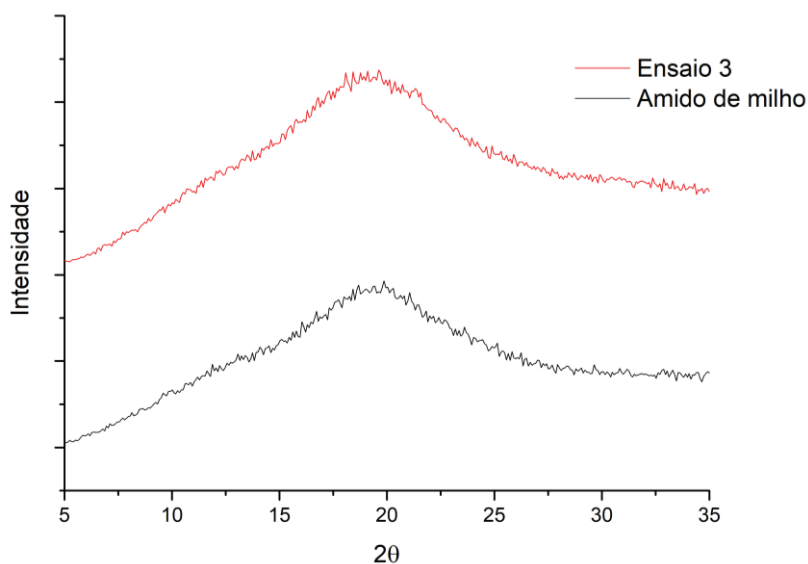
O maior tamanho de partícula (450 nm) foi produzido no ensaio 4, que corresponde a maior pressão e a maior vazão de emulsão do planejamento experimental. Quando a mistura solvente + antissolvente encontra-se em uma única fase, pressões mais altas resultam em maior solubilidade do soluto na mistura diminuindo a supersaturação. Essa diminuição da supersaturação causa a diminuição da taxa de nucleação levando a um maior crescimento das partículas precipitadas (HERRERO et al., 2006; FRANCESCHI et al., 2008a; FRANCESCHI et al., 2008b).

Os tamanhos de partículas encontrados nesse trabalho são semelhantes aos encontrados por Mattea et al. (2009), Santos et al. (2012) e Aguiar et al. (2016) que encapsularam diferentes matrizes. Portanto, essa análise mostra o potencial do uso de uma nova tecnologia para a produção de partículas, confirmando que o extrato de folha de yacon foi efetivamente encapsulado por SFEE.

4.8.5 Difração de raios - X (PDRX) das partículas

A FIGURA 40 apresenta os perfis de PXRD das partículas do ensaio 3 e do amido de milho não-processado. Os resultados de PXRD e da calorimetria exploratória diferencial (DSC) fornecem uma indicação sobre as alterações nas estruturas de polímeros e partículas, bem como indicam o desempenho da encapsulação.

FIGURA 40 – DIFRAÇÃO DE RAIOS -X DE HI-CAP NÃO PROCESSADO E PARTÍCULAS DO ENSAIO 3 (9 MPa e 1,5 mL/min)



FONTE: A autora (2019).

Os padrões de PXRD das amostras apresentaram reflexos de amorficidade como observado por Lima Reis et al. (2019), que estudaram a encapsulação de óleo essencial de folha de loro com o amido de milho por SFEE. O padrão de pico amplo

com diferentes intensidades é uma característica das estruturas amorfas, uma vez que o grau de desordem molecular causa dispersão nas bandas de difração.

Estruturalmente, o amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina. O material do grânulo está presente na forma de anéis concêntricos, conhecidos como anéis de crescimento. Esses anéis são organizados em regiões cristalinas e amorfas alternadas, motivo pelo qual é frequentemente descrito como um polímero semicristalino ou parcialmente cristalino. A região cristalina é constituída pelas duplas hélices das cadeias paralelas A e B da amilopectina, sendo mais compacta, enquanto que a região amorfa, menos ordenada, contém os pontos de ramificação das cadeias laterais da amilopectina e possivelmente alguma amilose (ALCÁZAR-ALAY e MEIRELES, 2015).

Os sólidos amorfos são mais solúveis que sólidos cristalinos, devido às energias livres envolvidas na dissolução do processo e menos resistentes ao calor por causa do arranjo aleatório das moléculas; portanto, é necessária baixa energia para separá-los (STULZER et al., 2009). Portanto, os compostos amorfos promovem um efeito terapêutico mais rápido devido ao aumento da taxa de dissolução.

O ensaio 3 apresentou característica e pico semelhante ao encontrado no amido de milho, mostrando a efetiva captura do composto ativo pelo amido e atestando o processo de encapsulação.

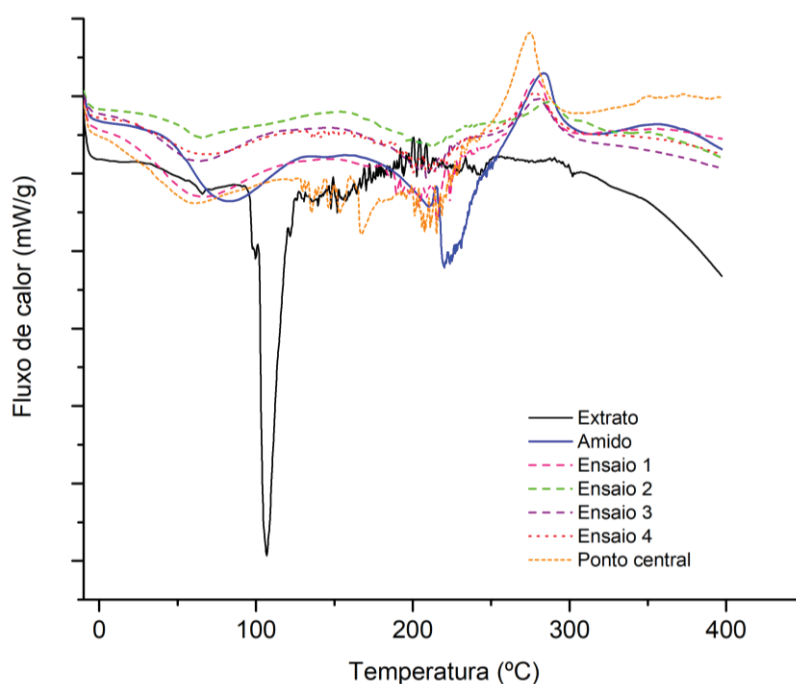
4.8.6 Caracterização por calorimetria diferencial de varredura (DSC) das partículas

A FIGURA 41 apresenta a análise de DSC do extrato de folhas de yacon, amido de milho modificado e das partículas obtidas por SFEE.

Os resultados mostram um pico endotérmico a 106,5 °C para o extrato, indicando o ponto de fusão da fração dos ácidos graxos. O amido de milho apresentou dois picos endotérmicos (82,5 e 213 °C), que indica o ponto de gelificação do amido e sua decomposição e um pico exotérmico (283,4 °C), devido à pirólise e despolimerização do amido (MATSUGUMA et al., 2009). Além disso, os resultados do DSC para todas as partículas dos ensaios realizados apresentaram comportamento semelhante ao apresentado pelo amido de milho e a ausência do pico do extrato sugerindo sua completa encapsulação na matriz polimérica. Desta forma, os resultados do DSC os corroboram com os observados por EE, TEM e

PXRD, isto é, extratos de folhas de yacon foram encapsulados com sucesso por SFEE.

FIGURA 41 – DSC DO EXTRATO, AMIDO NÃO PROCESSADO, ENSAIO 1 (9 MPa e 0,5 mL/min), ENSAIO 2 (13 MPa e 0,5 mL/min), ENSAIO 3 (9 MPa e 1,5 mL/min), ENSAIO 4 (13 MPa e 1,5 mL/min, PONTO CENTRAL (11 MPa e 1,0 mL/min)



FONTE: A autora (2019).

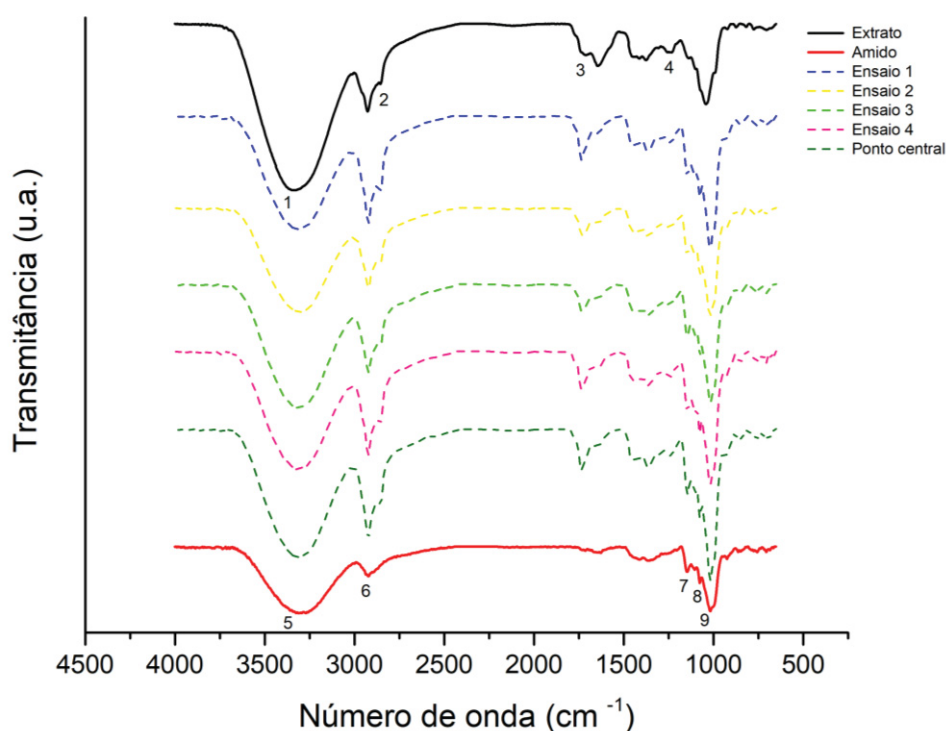
4.8.7 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 42 apresenta a análise de FTIR do extrato de folhas de yacon, amido de milho modificado e das partículas obtidas por SFEE. A análise de FTIR é usada para identificar grupos funcionais e fornece informações sobre as interações que ocorrem entre o amido de milho modificado e o extrato durante o processo de encapsulação.

No extrato de folha de yacon, o pico observado a $3332,38\text{ cm}^{-1}$ (1) pode ser devido a presença de ligação O-H, o pico a $2858,41\text{ cm}^{-1}$ (2) corresponde a presença de carboidrato-lipídio, pico a $1728,45\text{ cm}^{-1}$ (3) referem-se a presença de ácidos graxos (C=O) ligação éster, os picos observados entre $1728,45$ e $1243,70$

cm^{-1} (3, 4) pode indicar a presença de N-H bending, N-C stretching, lipids, nucleic acids and carbohydrate (C-O-C) (ALARA e ABDURAHMAN, 2019).

FIGURA 42 – FTIR DO EXTRATO DE FOLHAS DE YACON, AMIDO NÃO PROCESSADO, ENSAIO 1 (9 MPa e 0,5 mL/min), ENSAIO 2 (13 MPa e 0,5 mL/min), ENSAIO 3 (9 MPa e 1,5 mL/min), ENSAIO 4 (13 MPa e 1,5 mL/min, PONTO CENTRAL (11 MPa e 1,0 mL/min)



FONTE: A autora (2019).

O espectro de infravermelho do amido de milho modificado exibiu um forte pico a $3316,92 \text{ cm}^{-1}$ (5) devido a ligação O-H, pico a $2927,38 \text{ cm}^{-1}$ (6) é atribuído à deformação axial de ligações C-H, os picos de $1014,36$ até $1151,28 \text{ cm}^{-1}$ (7, 8 e 9) são atribuídos a deformações C-OH e CH_2 . Picos semelhantes foram encontrados por Lima et al. (2012) em seu estudo do amido de farinhas comerciais comestíveis.

As partículas obtidas no SFEE (ensaios 1-4 e ponto central) apresentaram picos na mesma faixa de números de ondas dos espectros do amido de milho modificado e do extrato, mostrando que nenhuma ligação química entre os dois compostos foi formada. Além disso, o extrato não sofreu degradação ou isomerização durante o processo de encapsulação.

4.8.8 Estabilidade antioxidante das amostras encapsuladas

A TABELA 25 apresenta a estabilidade antioxidante do extrato e das partículas produzidas pelo ensaio 3 durante 18 dias e expostas em duas diferentes condições de armazenamento. A alta atividade antioxidante para o método DPPH é indicada por um baixo valor de EC₅₀, ou seja, quanto menor o EC₅₀ maior a atividade antioxidante.

TABELA 25 – ESTABILIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E DAS PARTÍCULAS PRODUZIDAS PELO ENSAIO 3 POR 18 DIAS

Tempo (dias)	EC ₅₀ - DPPH (µg/mL) ^{1,2}			
	Atmosfera natural e exposição à luz		Estufa à 60 °C	
	Suspensão 3	Extrato	Ensaio 3 seco	Extrato
0	154.8 ± 2.4 ^c	148.2 ± 1.3 ^d	156.1 ± 2.6 ^b	148.2 ± 1.3 ^c
6	158.3 ± 1.9 ^{bc}	209.9 ± 5.3 ^c	161.5 ± 3.0 ^{ab}	186.4 ± 3.5 ^b
12	170.9 ± 4.2 ^{ab}	254.7 ± 2.9 ^b	168.6 ± 1.2 ^a	192.1 ± 4.2 ^b
18	178.5 ± 3.8 ^a	309.7 ± 3.2 ^a	170.5 ± 2.3 ^a	254.2 ± 3.8 ^a

¹EC₅₀ = CONCENTRAÇÃO EFETIVA PARA OBTER 50 % DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.
²LETRAS IGUAIS NA MESMA COLUNA INDICAM QUE NÃO HÁ DIFERENÇA SIGNIFICATIVA AO NÍVEL DE 5 %.

FONTE: A autora (2019).

O extrato da folha de yacon possui substâncias com reconhecidas atividades biológicas que quando expostas à luz, calor e oxigênio podem ser degradadas (CRUZ et al., 2019). Por isso, o objetivo dessa análise é observar o grau de proteção que o agente de encapsulação é capaz de fornecer ao extrato de folhas de yacon, uma vez que esse extrato pode ser usado na indústria de alimentos sendo exposto às condições de degradação citadas acima.

A suspensão encapsulada exposta à atmosfera natural e luz apresentou uma redução de 13 % de atividade antioxidante, enquanto o extrato desprotegido apresentou uma redução de aproximadamente 50 % em seus resultados de DPPH. Para a segunda condição de armazenamento, representada pelas amostras armazenadas em estufa à 60 °C, a suspensão encapsulada seca apresentou uma redução de 8 % na atividade antioxidante, enquanto o extrato bruto apresentou uma redução de aproximadamente 42%, mostrando que a luz foi o fator que mais favoreceu a degradação dos compostos presente nas amostras.

As amostras encapsuladas apresentaram maior conservação da atividade antioxidante quando comparadas ao extrato bruto, confirmando o efeito protetor do processo de encapsulação SFEE. Mesmo após os 18 dias em que as amostras encapsuladas foram submetidas às condições de degradação, apresentaram boa atividade antioxidante, pois segundo Campos et al. (2008) amostras com valores de EC_{50} inferiores a 250 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas bons antioxidantes.

A atividade antioxidante dos extratos de folhas de yacon é influenciada pelo conteúdo de fenólicos e flavonóides, também conhecidos como antioxidantes naturais. Ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido ferúlico, rutina e miricetina são os compostos encontrados nesses extratos (VALENTOVÁ e ULRICHOVÁ, 2003; ANDRADE et al., 2014).

As folhas, frutas e sementes são fontes naturais de antioxidantes e diversas pesquisas têm apontado seu uso como alternativa para a substituição dos antioxidantes sintéticos. Estes têm sido alvo de questionamento quanto a sua inocuidade, levando a indústria a procurar alternativas para a sua substituição (SIMONOVSKA et al., 2003; CRUZ et al., 2017).

Portanto, esses resultados sugerem que a encapsulação por SFEE do extrato de folhas de yacon em amido de milho, na concentração estudada, além de proteger o extrato, conservou a atividade antioxidante dos compostos ativos.

5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, os resultados dos rendimentos da ESC demonstraram bom desempenho do scCO_2 + cossolvente na recuperação de extratos de folhas e flores de yacon, porém os rendimentos máximos foram alcançados pelo Soxhlet usando a mistura etanol-água para as folhas e metanol para as flores.

Os resultados dos ensaios de fenólicos totais e atividade antioxidante demonstraram uma atividade antioxidante moderada a forte independente do método de extração empregado para as ambas a matrizes. Para as folhas, o extrato obtido por Soxhlet com etanol mostrou a maior atividade antioxidante e os extratos das flores obtidos por ESC e Soxhlet, ambos com a mistura etanol-água apresentaram os melhores resultados para compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Todos os extratos das folhas apresentaram composição semelhante de ácidos graxos e os extratos realizados a 50 °C/ 20 MPa/ RM 2:1 e a 70 °C/ 15 MPa/ RM 3:1 mostraram os maiores níveis de ácidos graxos insaturados. Os extratos obtidos a 50 °C/ 20 MPa/ RM 2:1 e por Soxhlet com etanol apresentaram os maiores valores de ácido γ -linolênico. Além disso, outros ácidos graxos importantes como os ácidos oleico, linoleico e eicosapentaenóico também foram identificados nos extratos.

Na avaliação antimicrobiana os extratos das flores obtidos por ESC apresentaram melhores resultados em comparação a Soxhlet frente a todas bactérias testadas. Todos extratos foram mais efetivos contra as bactérias gram-positivas e apresentaram algum halo de inibição para a bactéria *Listeria*. Apenas o extrato obtido por Soxhlet com etanol-água conseguiu inibição considerável para a bactéria *Salmonella*.

Pela combinação dos resultados de rendimento e das atividades biológicas testadas, o extrato das folhas obtido por Soxhlet com etanol foi selecionado para a continuidade do estudo com formação de partículas.

Miniemulsões estáveis de extrato de folhas de yacon em amido de milho modificado foram obtidas. As maiores eficiências de encapsulação (68,2 e 64,5 %) foram obtidas para a menor pressão estudada (9 MPa) e com teor residual de solvente orgânico dentro do limite estabelecido pela Organização Mundial de Saúde.

Suspensões estáveis, com característica amorfa, no formato de esferas e cápsulas, do extratos de folhas de yacon foram formadas pelo processo SFEE.

As partículas conservaram a característica bioativa do composto ativo, demonstrada por meio da análise de estabilidade antioxidante.

Em suma, os resultados desse estudo sugerem que as folhas e flores de *Smallanthus sonchifolius* podem representar uma fonte valiosa de vários compostos bioativos, tanto para aplicações biomédicas, cosméticas ou farmacêuticas, quanto para serem utilizados como ingredientes alimentares. Além disso, os resultados também mostram a técnica SFEE como uma tecnologia promissora para encapsulação de compostos bioativos, propiciando uma maior proteção do princípio ativo contra fatores que causam degradação.

Os estudos de encapsulação existentes na literatura são sobre a raiz de yacon, faltando dados sobre a encapsulação do extrato de folhas de yacon, destacando então, a importância desta pesquisa. Além disso, este estudo mostra o potencial do uso de métodos verdes para a produção de partículas.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir da avaliação dos resultados apresentados neste estudo podem ser sugeridos alguns pontos para serem desenvolvidos em trabalhos futuros:

- ✓ Avaliação da atividade antioxidante das folhas e flores de yacon utilizando metodologia in vivo e/ou aplicações em sistemas reais, como alimentos;
- ✓ Estudar a influência da variação da temperatura e da vazão do scCO_2 nas características das partículas, eficiência de encapsulação e remoção do solvente orgânico;
- ✓ Estudar o tempo de estabilidade das suspensões formadas em diferentes meios (alcalino e/ou ácido).
- ✓ Analisar a atividade antimicrobiana das suspensões e partículas formadas.
- ✓ Realizar estudos de liberação in vitro em meios simuladores de digestão, como o uso de saliva, sucos gástricos, duodenal e bile, formulados a partir de sais, ácidos e enzimas, de modo a conhecer o comportamento das partículas nesses sistemas.

7 PRODUÇÃO TÉCNICA-CIENTÍFICA

7.1 ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. CRUZ, P. N.; FETZER, D. L.; Do AMARAL, W.; De ANDRADE, E. F.; CORAZZA, M. L.; MASSON, M. L. Antioxidant activity and fatty acid profile of yacon leaves extracts obtained supercritical CO₂ + ethanol solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 146, p. 55 - 64, 2019.
2. FETZER, D. L.; CRUZ, P. N.; HAMERSKI, F.; CORAZZA, M. L. Extraction of baru (*Dipteryx alata vogel*) seed oil using compressed solvents technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 137, p. 23 – 33, 2018.

7.2 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

1. CRUZ, P. N.; FETZER, D. L.; Do AMARAL, W.; De ANDRADE, E. F.; MASSON, M. L.; CORAZZA, M. L. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Yacon Leaves (*Smallanthus sonchifolius*). V Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (Prosciba). Publicado em setembro 2019.
2. CRUZ, P. N.; LIMA REIS, P. M. C.; MASSON, M. L.; CORAZZA, M. L.; FERREIRA, S. R. S. Encapsulation of yacon leaves extracts (*Smallanthus sonchifolius*) by Supercritical Fluid Extraction of Emulsions (SFEE). V Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (Prosciba). Publicado em setembro 2019.
3. CRUZ, P. N.; FETZER, D. L.; Do AMARAL, W.; MASSON, M. L.; CORAZZA, M. L. Supercritical extraction of yacon flowers (*Smallanthus sonchifolius*). V Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (Prosciba). Publicado em setembro 2019.
4. FETZER, D. L.; CRUZ, P. N.; CORAZZA, M. L. Extraction yeild of baru (*Dipteryx alata vogel*) seed oil using compressed propane and different particle

size. V Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (Prosciba). Publicado em setembro 2019.

5. CRUZ, P. N.; FETZER, D. L.; Do AMARAL, W.; De ANDRADE, E. F.; MASSON, M. L.; CORAZZA, M. L. Rendimento e modelagem matemática da extração usando CO₂ supercrítico + etanol de folhas de yacon (*Smallanthus sonchifolius*). IV simpósio Paranaense de modelagem, simulação e controle de processos, realizado nos dias 14 e 15 de março de 2019, Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná.

REFERÊNCIAS

- ADAM, M.; JUKLOVÁ, A.; BAJER, T.; EISNER, K.; VENTURA, K. Comparison of three different solid-phase microextraction fibers analysis of essential oils in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1084, p. 2–6, 2005.
- AGUIAR, A. C.; SILVA, L. P.S.; de REZENDE, C. A.; BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J. Encapsulation of pepper oleoresin by supercritical fluid extraction of emulsions. **J. Supercrit. Fluids**, v. 112, p. 37–43, 2016.
- ANDRADE, E. F. **Composição química e atividade biológica de extratos de folhas e flores de yacon (*Smallanthus sonchifolius*)**. Curitiba, 110 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- ANDRADE E. F.; LEONE R. S., ELLENDERSEN, L. N.; MASSON, M. L. Phenolic profile and antioxidant activity of extracts of leaves and flowers of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 499–506, 2014.
- ANDRADE, K. S.; PONCELET, D.; FERREIRA, S. R. S. Sustainable extraction and encapsulation of Pink pepper oil. **J. Food Eng.** v. 204, p. 38-45, 2017.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B. CEPPA**, Curitiba v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists – Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18. ed. Maryland: AOAC, 2005.
- AOCS - American Oil Chemists' Society, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 5th ed., AOCS Press, Champaign, 1998.
- AYBAR, M.J.; SÁNCHEZ RIERA A. N.; GRAU, A.; SÁNCHEZ, S. S. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 74, n. 2, p. 125-132, 2001.
- ALARA, O.R.; ABDURAHMAN, N.H. GC-MS and FTIR analyses of oils from Hibiscus sabdariffa, Stigma maydis and Chromolaena odorata leaf obtained from Malaysia: Potetial sources fatty acids, **Chemical Data Collections**, v. 20, p. 100200, 2019.
- ALBUQUERQUE, E.N.; ROLIM, P.M. Potencialidades do yacon (*Smallanthus sonchifolius*) no diabetes Mellitus. **Revista Ciências Médicas**, v. 20, n. 3-4, p. 99-108, 2011.
- ALCÁZAR-ALAY, S. C.; MEIRELES, M. A. A. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. **Food Sci. Technol.** v. 35, p. 215–236, 2015.

ARMANDO, T. Q.; KUBOTA, S.; OJI, K.; SEKIYA, K.; TAKASHIMA, K.; TAMURA, H.; YAMATOKI, E. Extraction of useful component in yakon (*polynnia sonchifolia*) and application thereof. Application filed by Kagawa Industry Support Foundation, National Agriculture & Bio-Oriented Research Organization, Sanuki Engyo Kk. Japão JP2004269444A. 2003

ÁVILA, H. P.; SMÂNIA, E. F. A.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA JÚNIOR, A. Structure–activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 22, p. 9790-9794, 2008.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

BALOUIRI M, SADIKI M, Ibensouda S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **J. Pharm. Anal**, 2016.

BARCELLONA, C. S.; CABRERA, W. M.; HONORÉ, S. M.; MERCADO, M. I.; SÁNCHEZ, S. S.; GENTA, S. B. Safety assessment of aqueous extract from leaf *Smallanthus sonchifolius* and its main active lactone, enhydrin. **J. Ethnopharmacol.** v. 144, p. 362–370, 2012.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-23, 2006.

BENELLI, P. RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: mathematical modeling and extract composition, **J. Supercrit. Fluids**, v. 55, p. 132–141, 2010.

BENELLI, P. **Obtenção de extratos bioativos de folhas de Casearia sylvestris e encapsulamento em biopolímero utilizando a tecnologia supercrítica**. Santa Catarina, 200 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

BOAVENTURA, B. C. B. et al. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, p. 657-664, 2012.

BOX, G. E. P.; WETZ, J. **Criteria for Judging Adequacy of Estimation by an Approximating Response Function**, Wisconsin Univ Madison Dept Of Statistics, 1973.

BRUL S, COOTE P. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. Int. **J. Food Microbiol**, 1999.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; ARCE, M. A. B. R. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química nova**, v. 32, n. 4, 2009.

BRUNNER, G. Gas extraction: **An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process**. Darmstadt: Steinkopff, v. 4, p. 387, 1994.

BRUNNER, G. Applications of supercritical fluids. **Annu Rev. Chem. Biomol. Eng.**, v. 1:3, p. 21 - 42, 2010.

BUBALO, M. C.; VIDOVIĆ, S.; REDOVNIKOVIĆ, I. R.; JOKIĆ, S. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents, **Food Bioprod. Process.** v. 109, p. 52–73, 2018.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S.R.S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresour. Technol.** V. 99, p. 8413–8420, 2008.

CARDOSO, C. A. L.; SILVA, J. R. M.; KATAOKA, V. M. F.; BRUM, C. S.; POPPI, N. R. Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 297-301, 2008.

CARERI, M.; FURLATTINI, L.; MANGIA, A.; MUSCI, M.; ANKLAM, E.; THEOBALD, A. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: a chemometric approach. **J. Chromatogr. A**, v. 912, p. 61–71, 2001.

CASTRO, A.; CABALLERO, M.; HERBAS, A.; CARBALLO, S. Antioxidants in yacon products and effect of long term storage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 3, p. 432-435, 2012.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2383-2389, 2010.

CHATTOPADHYAY, P.; HUFF, R.; SHEKUNOV, B. Y. Drug encapsulation using supercritical fluid extraction of emulsions. **J. Pharm. Sci.** v. 95, p. 667–679, 2006.

CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

COCERO, M. J.; MARTIN, A. Precipitation Processes with Supercritical Fluids: Patents Review. **Recent Patents on Engineering**, v. 2, n. 1, p. 9-20, 2008.

COCERO, M. J.; MARTÍN, A.; MATTEA, F.; VARONA, S. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 546-555, 2009.

COUNDRAY, C.; BELLANGER, J.; CASTIGLIA-DELAUVAUD, C.; RÉMÉSY, C.; VERMOREL, M.; RAYSSIGNUIER, Y. Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, p. 375-380, 1997.

CRUZ, P. N.; PEREIRA, T. C. S.; GUINDANI, C.; OLIVEIRA, D. A.; ROSSI, M. J.; FERREIRA, S. R. S. Antioxidant and antibacterial potential of butia (*Butia catarinensis*) seed extracts obtained by supercritical fluid extraction. **J. Supercrit. Fluids**, v. 119, p. 229-237, 2017.

CRUZ, P. N.; FETZER, D. L.; do AMARAL, W.; de ANDRADE, E. F.; CORAZZA, M. L.; MASSON, M. L. Antioxidant Activity and fatty acid profile of yacon leaves extracts obtained by Supercritical CO₂ + ethanol solvent. **J. Supercritical Fluids**, v. 146, p. 55-64, 2019.

CRUZ, M. C. R.; DAGOSTIN, J. L. A.; PERUSSELLO, C.A.; MASSON, M. L. Assessment of physicochemical characteristics, thermal stability and release profile of ascorbic acid microcapsules obtained by complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 71-82, 2019.

CZAIKOSKI, K.; MESOMO, M. C.; SCHEER, A. P.; SANTA, O. R. D.; QUEIROGA, C. L.; CORAZZA, M. L. Kinetics, composition and biological activity of *Eupatorium intermedium* flower extracts obtained from scCO₂ and compressed propane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 97, p. 145-153, 2015.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

DANIELSKI, L.; ZETZL, C.; HENSE, H.; BRUNNER, G. A process line for the production of raffinated rice oil from rice bran. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 133 -141, 2005.

De MOURA, N. A.; CAETANO, B. F. R.; SIVIERI, K.; URBANO, L.H.; CABELLO, C.; RODRIGUES, M. A. M.; BARBISAN, L. F. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 20, p. 2902-2910, 2012.

DESAI, K.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, London, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.H. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. Ed. UNESP, 2 ed., São Paulo, 2002.

DINIZ, A. C. B.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento, **Acta Bot. Bras.** v. 21 n. 2, p. 443-445, 2007.

DOUBLIER, J. L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, p. 202-214, 2000.

EGGERS, R.; JAEGER, P. Extraction Systems. In: (Ed.). **Extraction Optimization in Food Engineering**: CRC Press, 2003.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. W. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**. **Nova York**, v.18, n. 10, p. 872-879, 2002.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations), WHO (World Health Organization), **Fats and Oils in Human Nutrition**, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Rome, 1994.

FETZER, D. L.; CRUZ, P. N.; HAMERSKI, F.; CORAZZA, M. L. Extraction of baru (*Dipteryx alata vogel*) seed oil using compressed solvents technology. **J. Supercrit. Fluids**, v. 137, p. 23-33, 2018.

FDA, Guidance for Industry. Q3C – **Tables and List: Food and Drug Administration**, 2012, Available from (<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073395.pdf>).

FRANCESCHI, E.; DE CESARO, A. M.; FEITEN, M.; FERREIRA, S. R. S.; DARIVA, C.; KUNITA, M.H.; et al., Precipitation of β -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. **J. Supercrit. Fluids**, v. 47, p. 259-269, 2008a.

FRANCESCHI, E.; KUNITA, M. H.; TRES, M. V.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; et al., Phase behavior and process parameters effects on the characteristics of precipitated theophylline using carbon dioxide as antisolvent, **J. Supercrit. Fluids**, v. 44, p. 8-20, 2008b.

FREITAS, S., MERKLE, H. P., GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 313-332, 2005.

GALANAKIS, C. M.; TORNBERG, E.; GEKAS, V. Dietary fiber suspensions from olive mill wastewater as potential fat replacements in meatballs. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1018-1025, 2010.

GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 213-224, 1999.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p.1401-1412, 1995.

GÓMEZ, A. M.; OSSA, E. M. Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide. **Chemical Engineering Journal**, v. 88, p. 103-109, 2002.

GOMES, C.; MOREIRA, R. G.; CASTELL-PEREZ, E. Poly (*DL-lactide-co-glycolide*) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped trans-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 16-24, 2011.

GOMIDE, R. (1983). Operações com sistemas sólidos granulares, v. 1, Catalogation of Brazilian Chamber Publication Book, São Paulo, Brazil.

GOUIN, S., Microencapsulation: industrial appraisal of existing Technologies and trends, **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, 330-347, 2004.

GRAU, A.; REA, J. Yacon. *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson. In: HERMANN, M.; HELLER, J. Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: IPK, Gatersleben / IPGRI, p. 199-242, 1997.

GUIGOZ, Y.; ROCHAT, F.; PERRUISSEAU-CARRIER, G.; ROCHAT, I.; SCHIFFRIN, E. J. Effects of oligosaccharides on the fecal flora and non-specific immune system in elderly people. **Nutrition of Research**, v. 22, n. 1-2, p. 13-25, 2002.

GUSSO, A. P.; MATTANNA, P.; RICHARDS, N. Yacon: benefícios à saúde e aplicações tecnológicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 5, p. 912-919, 2015.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae. A review. **Food Chem.** V. 98, p. 136–148, 2006.

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal the Chromatography A**, v. 1217, p. 2495-2511, 2010.

HIERRO, M. T.; SANTA-MARIA, G. Extracción con fluidos supercríticos: Aplicación a los alimentos. **Cromatografía y Técnicas Afines**, v. 12, p. 62-8, 1991.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

INOUE, A.; TAMOGAMI, S.; KATO, H.; NAKAZATO, Y.; ARIYAMA, M.; KODAMA, O.; et al. Antifungal melampolides from leaf extracts of *Smallanthus sonchifolius*. **Phytochemistry**, v. 39, n.4, p. 845-848, 1995.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; BHANDARI, B.; HE, Y. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. **Food Res. Int.** v. 41, p. 172–183, 2008.

KATOUIZIAN, I.; JAFARI, S. M. Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. **Trends in food Science & Technology**, v. 53, p. 34-48, 2016.

KING, M.B.; MUBARAK, A.; KIM, J.D.; BOTT, T.R. The mutual solubilities of water with supercritical and liquid carbon dioxides. **J. Supercrit. Fluids**, v. 5 p. 296–302, 1992.

KING, A. H. **Encapsulation of food ingredients**. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G. A. Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: ACS, p. 26 - 39, (ACS Symposium. Series, 590), 1995.

KITZBERGER, C. S. G.; SMÂNIA JR, A.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 631-638, 2007.

KNEZ, Z.; MARKOCIC, E.; LEITGEB, M.; PRIMOZIC, M.; HRNCIC, M. K.; SKERGET, M. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 235-243, 2014.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C. M. Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for $\dot{U} - 3$ unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, n. 3, p. 34-357, 2001.

LEE, J.-Y.; KIM, Y.-S. ; SHIN, D.-H. Antimicrobial synergistic effect of linolenic acid and monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. **J. Agric. Food Chem.** v. 50, p. 2193–2199, 2002.

LÉVAI, G.; MARTÍN, Á.; De PAZ, E.; RODRÍGUEZ-ROJO, S.; COCERO, M. J. Production of stabilized quercetin aqueous suspensions by supercritical fluid extraction of emulsions, **J. Supercrit. Fluids**, v.100, p. 34–45, 2015.

LI, S. Application of Supercritical Fluids in Traditional Chinese Medicines and Natural Products. In: MARTÍNEZ, J. L. Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds. CRC Press, 2008. cap 7, p. 215-242.

LI, M., ROUAUD, O., PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 26–39, 2008.

LIMA, B.N.B., CABRAL, T.B., NETO, R.P.C., TAVARES, M.I.B. Characterization of Commercial Edible Starch Flours. **Polímeros**, v. 22, p. 486-490, 2012.

LIMA REIS, P. M. C.; MEZZOMO, N.; AGUIAR, G. P. S. ; SENNA, E. M. T. L.; HENSE, H.; FERREIRA, S. R. S. Ultrasound-assisted emulsion of laurel leaves essential oil (*Laurus nobilis* L.) encapsulated by SFEE. **J. Supercrit. Fluids**, v. 149, p. 284-292, 2019.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1-2, p. 137-147, 2009.

LIN, F.; HASEGAWA, M.; KODAMA, O. Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 10, p. 2154-2159, 2003.

LOBO, A. R.; COCATO, M. L.; BORELLI, P.; GAIEVSKI, E. H. S.; CRISMA, A. R.; NAKAJIMA, K.; NAKANO, E. Y.; COLLI, Celia. Iron bioavailability from ferric pyrophosphate in rats fed with fructan containing yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flour. **Food Chemistry**, v. 126, p. 885-891, 2011.

LOULI, V.; RAGOUSSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 2, p. 201-208, 2004.

LOTITO, S. B.; FREI, B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: Contrasting in vivo and vitro effects. **Free Radical Biol.** v. 36, p. 201–211, 2004.

LOULI, V.; N. RAGOUSSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresour. Technol.** v. 92, p. 201–208, 2004.

MACHADO JR, F. R. S.; REIS, D. F.; BOSCHETTO, D. L.; BURKERT, J. F. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V.; BURKERT, C. A. V. Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO₂. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 17–21, 2014.

MACHLIN, L. J., BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 1, n. 6, p. 441-445, 1987.

MARIQUE, I.; PÁRRAGA, A.;HERMANN, M. Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos Andinos: Uma década de investigación para el desarrollo (1993-2003). Jarabe de yacón: principios y procesamiento, Lima, **Centro Internacional de La Papa**, p. 40, 2003.

MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W.R.W.; SINGH, H.; JAHIM, J.M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: effects of solvents and extraction Methods. **Sep. Purif. Technol.** V. 52, p. 487–496, 2007.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 102-105, 2003.

MATSUGUMA, L. S. ; LACERDA, L. G.; SCHNITZLER, E.; Da SILVA CARVALHO FILHO, M. A.; LANDI FRANCO, C. M.; DEMIATE, I. M. Characterization of native and oxidized starches of two varieties of Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza*, B.) from two production areas of Paraná state, Brazil. **Brazilian Arch. Biol. Technol.** v. 52, p. 701–713, 2009.

MATTEA, F.; MARTÍN, Á; MATÍAS-GAGO, A.; COCERO, M. J. Supercritical antisolvent precipitation from an emulsion: β -Carotene nanoparticle formation. **J. Supercrit. Fluids**, v. 5, p. 238-247, 2009.

MAZZUTTI, S.; RIEHL, C. A. S.; IBAÑEZ, E.; FERREIRA, S. R. S. Green-based methods to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*. **J. Supercrit. Fluids**, v. 119, p. 211–220, 2017.

MEDEIROS, G. R. **Modelagem matemática da liberação de compostos hidrofílicos incorporados por dupla emulsão em micropartículas de PLGA**. Santa Catarina, 110 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother. Res.** v. 15, p. 127-30, 2001.

MESOMO, M. C.; CORAZZA, M. L.; NDIAYE, P. M.; SANTA, O. R. D.; CARDOSO, L.; SCHEER, A. P. Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical composition and antibacterial activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 80, p. 44 – 49, 2013.

MEZZOMO, N. **Óleo de amêndoa de pêssogo: avaliação da técnica de extração, da qualidade dos extratos e parâmetros para ampliação de escala**. Santa Catarina, 100 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MEZZOMO, N.; De PAZ, E.; MARASCHIN, M.; MARTÍN, Á; COCERO, M. J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical anti-solvent precipitation of carotenoid fraction from pink shrimp residue: effect of operational conditions on encapsulation efficiency. **J. Supercrit. Fluids**, v. 66, p. 342–349, 2012.

MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S. Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: a review. **J. Chem.** p. 1–16, 2016.

MICHIELIN, E. M. Z. **Obtenção de extrato de erva baleeira (*Cordia verbenacea* D.C.) por diferentes técnicas: medida da atividade biológica, modelagem matemática e determinação do equilíbrio de fases**. Santa Catarina, 110 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MICHIELIN, E. M. Z.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA Jr., A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresour. Technol.** v. 100, p. 6615–6623, 2009.

MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P.; HAMID, N. S. A.; YUSOF, S. Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index, and pH of orange beverage emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Eng. Aspects**, v. 315, p. 47-56, 2008.

MOURE A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H., et al., Natural antioxidants from residual sources. **Food Chem.** V.72, p. 145–171, 2001.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide:** CRC Press, 2000.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Aplicações Na Ciência e Na Indústria**, Bookman editora, 2010.

O'FALLON, J.V; BUSBOOM, J.R.; NELSON, M.L.; GASKINS, C.T. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feed stuffs. **J. Anim. Sci.** v. 6, p. 1511–1521, 2007.

OLIVEIRA, M. A.; NISHIMOTO, E. K. Avaliação do desenvolvimento de plantas de yacon (*Polymnia sonchifolia*) e caracterização dos carboidratos de reservas em HPLC. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, n. 2, p. 215-220, 2004.

OLIVEIRA, R. B.; PAULA, D. A. C.; ROCHA, B. A.; FRANCO, J. J.; GOBBO-NETO, L.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, W. F.; COSTA, F. B. Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: The yacon example. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 434-441, 2011.

OLIVEIRA, R. B.; CHAGAS-PAULA, D. A.; SECATTO, A.; GASPAROTO, T. H.; FACCIOLI, L. H.; CAMPANELLI, A. P.; COSTA, F. B. Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 497-505, 2013.

OLIVEIRA, D. A.; ANGONESE, M.; GOMES, C.; FERREIRA, S. R. S. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **J. Supercrit. Fluids**, v. 111, p. 55-62, 2016.

OLIVEIRA, D. A.; MEZZOMO, N.; GOMES, C.; FERREIRA, S. R. S. Encapsulation of passion fruit seed oil by means of supercritical antisolvent process. **J. Supercrit. Fluids**, v. 129, p. 96-105, 2017.

OZCELIK, B.; LEE, J. H.; MIN, D. B. Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. **J. Food Sci.** v. 68, p. 487–490, 2003.

PARK, J.; HAN, K. The spermatogenic effect of yacon extract and its constituents and their inhibition effect of testosterone metabolism. **Biomol. Ther.** v. 21, p. 153–160, 2013.

PALMA, M.; TAYLOR, L. T.; VARELA, R. M.; CUTLER, S. J.; CUTLER, H. G. Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical fluid extraction and analysis for antimicrobial and agrochemical activities. **J. Agric. Food Chem.** v. 47, p. 5044 – 5048, 1999.

PEREIRA, D. I.; GIBSON, G.R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on sérum lipid levels in humans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 259- 281, 2002.

PEREIRA, C. G.; MARQUES, M. O. M.; BARRETO, A. S.; SIANI, A. C.; FERNANDES, E. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO₂ + ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 30, n. 1, p. 51-61, 2004.

PEREIRA, M. G.; HAMERSKI, F.; ANDRADE, E. F.; SCHEER, A. D. P.; CORAZZA, M. L. Assessment of subcritical propane, ultrasound - assisted and Soxhlet extraction of oil from sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis) seeds. **J. Supercrit. Fluids**, v. 128, p. 338–348, 2017.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZÍA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, p. 137-50, 2006.

PESSOA, A. S.; PODESTÁ, R.; BLOCK, J. M.; FRANCESCHI, E.; DARIVA, C.; LANZA, M. Extraction of pequi (*Caryocar coriaceum*) pulp oil using subcritical propane: Determination of process yield and fatty acid profile. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 101, p. 95-103, 2015.

PORTA, G.D.; REVERCHON, E. Nanostructured microspheres produced by supercritical fluid extraction of emulsions. **Biotechnol. Bioeng.** V. 100, p. 1020–1033, 2008.

POURMORTAZAVI, S. H.; HAJIMIRSADEGHI, S. M. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **J. Chromatogr. A**, v. 1163, p. 2–24, 2007.

PRIAMO, W. L.; CEZARO, A. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. **Journal of Supercritical fluids**, v. 54, p. 103 – 109, 2010.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RÉ, M. I. Cápsulas inteligentes. **Ciência Hoje**, v. 27, n. 162, p. 24 - 29, 2000.

REIS, P. M. C. L.; DARIVA, C.; VIEIRA, G. A. B.; HENSE, H. Extraction and evaluation of antioxidant potential of the extracts obtained from tamarind seeds (*Tamarindus indica*), sweet variety. **J. Food Eng.** v. 173, p. 116–123, 2016.

RIBANI, M; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n 5, p. 771-780, 2004.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v. 84, n. 21-22, p. 705-712, 2009.

RODRIGUEZ, J. M. F.; SOUZA, A. R. C.; KRÜGER, R. L.; BOMBARDELLI, M. C. M.; MACHADO, C. S.; CORAZZA, M. L. Kinetics, composition and antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa*) root extracts obtained with supercritical CO₂ and co-solvent, **J. Supercrit. Fluids**, v. 135, p. 25–33, 2018.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 92, p. 235–254, 2005.

ROSSI, J. A. J.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-58, 1965.

SANTOS, A. B. dos; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Preparation and characterization of paprika oleoresin microcapsules obtained by spray drying. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 322–326, 2005.

SANTOS, D. T.; MARTÍN, Á; MEIRELES, M. A. A.; COCERO, M. J. Production of stabilized submicrometric particles of carotenoids using supercritical fluid extraction of emulsions. **J. Supercrit. Fluids**, v. 61, p. 167–174, 2012.

SANTOS, Ê. R. M.; OLIVEIRA, H. N. M.; OLIVEIRA, E. J.; AZEVEDO, S. H. G.; JESUS, A. A.; MEDEIROS, A. M.; DARIVA, C.; SOUSA, E. M. B. D. Supercritical fluid extraction of *Rumex Acetosa* L. roots: yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. **J. Supercrit. Fluids**, v. 122, p. 1–9, 2017.

SILVA, E. K.; ROSA, M. T. M.; MEIRELES, M. A. A. Ultrasound-assisted formation of emulsions stabilized by biopolymers. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 50–59, 2015.

SIMONOVSKA, B.; VOVK, I.; ANDRENSK, S.; VALENTOVA, K.; ULRICHOVA, J. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. **Journal of Chromatography A**, v. 1016, p. 89-98, 2003.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999.

SMITH, R.L.; YAMAGUCHI, T.; SATO, T.; SUZUKI, H.; ARAI, K. Volumetric behavior of ethyl acetate, ethyl octanoate, ethyl laurate, ethyl linoleate, and fish oil ethyl esters in the presence of supercritical CO₂. **J. Supercrit. Fluids**, v. 13, p. 29–36, 1998.

SLOMKOWSKI, S.; ALEMÁN, J. V.; GILBERT, R. G.; HESS, M.; HORIE, K.; JONES, R. G.; KUBISA, P.; MEISEL, I.; MORMANN, W.; PENCZEK, S.; STEPTO, R. F. T. Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems (IUPAC Recommendations 2011). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 2229–2259, 2011.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.** v. 10, p. 102–110, 2005.

SMÂNIA JR, A.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA E. F. A.; GIL, M. L.; BENCHETRIT, L. C.; CRUZ, F. S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal Ethnopharmacol**, v. 45, n. 3, p. 177-181, 1995.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v. 15, n.1, p. 71-81, 2002.

SOUZA, A. R. C.; GUEDES, A. R.; RODRIGUEZ, J. M. F; BOMBARDELLI, M. C. M.; CORAZZA, M. L. Extraction of *Arctium Lappa* leaves using supercritical CO₂ + ethanol: Kinetics, chemical composition, and bioactivity assessments. **J. Supercrit. Fluids**, v. 140, p. 137–146, 2018.

STRATIL, P., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta**, v.71, p.1741-1751, 2007.

STULZER, H. K.; TAGLIARI, M. P.; PARIZE, A. L.; SILVA, M. A. S.; LARANJEIRA, M. C. M. Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spraydrying. **Mater. Sci. Eng. C**. v. 29, p. 387–392, 2009.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2014.

SUFLUX. Supercritical plant. Disponível em: <<http://www.suflux.com>>. Acesso em: 2 maio. 2014.

SUN, L.; ZHANG, J.; LU, X.; ZHANG, L.; ZHANG, Y. Evaluation to the activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. **Food Chem. Toxicol.** v. 49, p. 2689–2696, 2011.

TARKO, T.; DUDA-CHODAK, A.; TUSZYŃSKI, T. Simulation of Phenolic Compounds Transformations and Interactions in an In Vitro Model of the Human Alimentary Tract. **Food Science and Technology International**, v. 15, n. 3, p. 235–241, 2009.

TEKENAKA, M.; YAN, X.; ONO, H.; YOSHIDA, M.; NAGATA, T.; NAKANISHI, T. Caffeic acid derivatives in roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **J. Agricult. Food Chem.** v. 51, p. 793–796, 2003.

The Clinical and Laboratory Standards Institute (2016) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI supplement M100S.

VALENTOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* – prospective andean crops for the prevention of chronic diseases. **Biomed Papers**, v. 147 n. 2, p. 119–130, 2003.

VALENTOVÁ, K.; CVAK, L.; MUCK, A.; ULRICHOVÁ, J.; SIMANEK, V. Antioxidant Activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. **Eur. J. Nutr.** v. 42, p. 61 – 66, 2003.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JR, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 370–380, 2007.

VALTUEÑA, S.; PELLEGRINI, N.; FRANZINI, L.; BIANCHI, M. A.; ARDIGÓ, D.; RIO, D. D.; PIATTI, P.; SCAZZINA, F.; ZAVARONI, I.; BRIGHENTI, F. Food selection based on total antioxidant capacity can modify antioxidant intake, systemic inflammation, and liver function without altering markers of oxidative stress. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 5, p. 1290–1297, 2008.

VASCO, C., RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, p.816–823, 2008.

WANG, X.; GIBSON, G. R. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **Journal Applied Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 373– 380, 1993.

WANG, Y.; LIU, W.; CHEN, X. D.; SELOMULYA, C. Micro-encapsulation and stabilization of DHA containing fish oil in protein-based emulsion through mono-disperse droplet spray dryer. **J. Food Eng.** v. 175, p. 74–84, 2016.

WATERS, 2013. Disponível em:

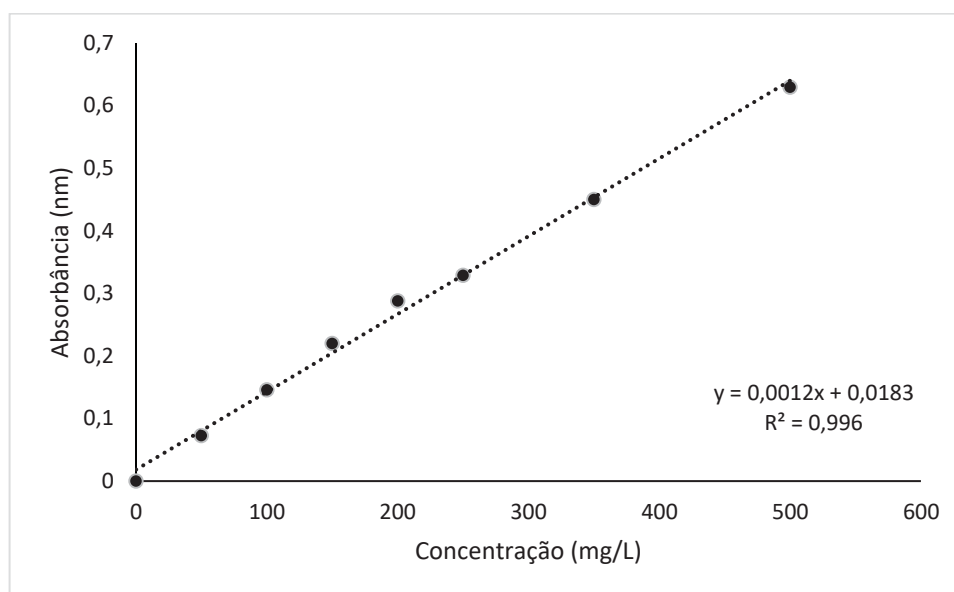
<http://www.waters.com/waters/pt_BR/Supercritical-Fluid-Extraction-%28SFE%29-Systems/nav.htm?cid=10146521&locale=pt_BR>. Acesso em: 10 set. 2013.

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, v. 128, n. 3, p. 379-391, 2001.

YEO, S. D.; KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 3, p. 287-308, 2005.

APÊNDICE 1 – CURVA ANALÍTICA DE ÁCIDO GÁLICO

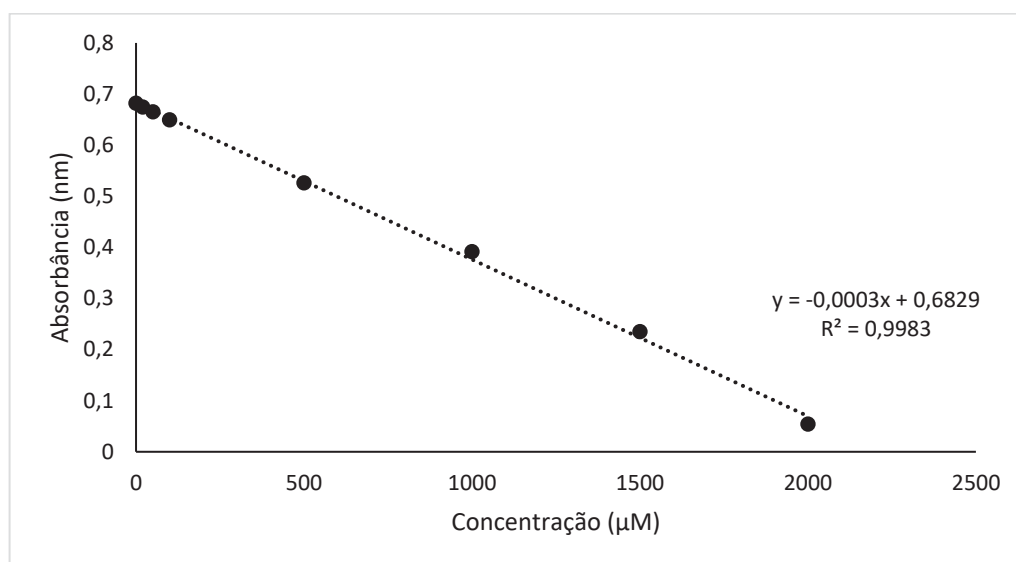
FIGURA 43 – CURVA ANALÍTICA DE ÁCIDO GÁLICO UTILIZADA NO CÁLCULO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON



FONTE: A autora (2019).

APÊNDICE 2 – CURVA ANALÍTICA DE TROLOX

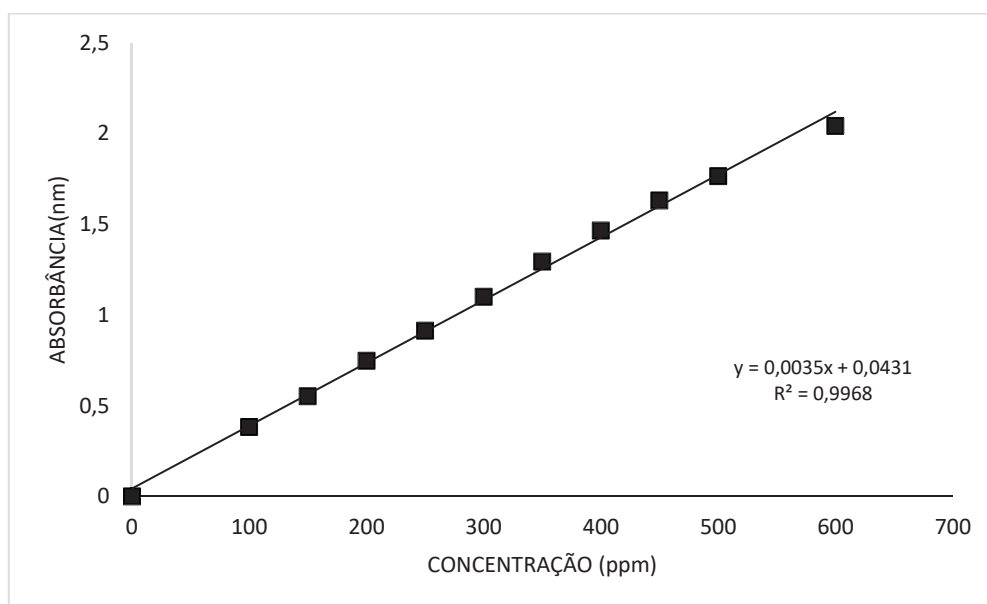
FIGURA 44 – CURVA ANALÍTICA DE TROLOX UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON



FONTE: A autora (2019).

APÊNDICE 3 – CURVA ANALÍTICA DE EXTRATO DE FOLHAS DE YACON

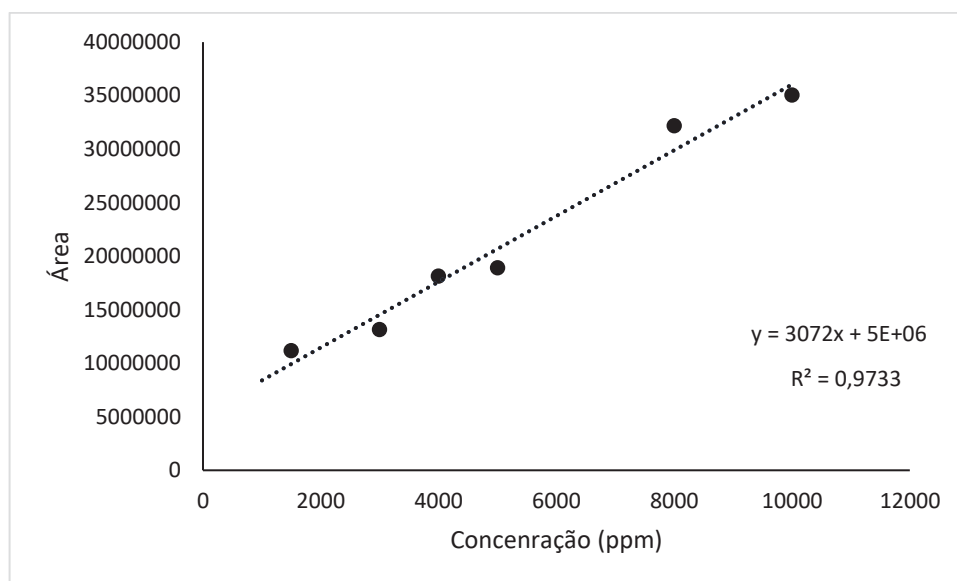
FIGURA 45 – CURVA ANALÍTICA DE EXTRATO DE FOLHAS DE YACON UTILIZADA NO CÁLCULO DE EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS SUSPENSÕES



FONTE: A autora (2019).

APÊNDICE 4 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO TEOR RESIDUAL DE ACETATO DE ETILA

FIGURA 46 – CURVA ANALÍTICA UTILIZADA NO CÁLCULO DO TEOR RESIDUAL DE ACETATO DE ETILA



FONTE: A autora (2019).